

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

ANALYSE STRUCTURALE ET THERMODYNAMIQUE DE  
L'HOMODIMÉRIISATION DE MAX ET DE SON EFFET TRANSCRIPTIONNEL  
SUR LES GÈNES CIBLES DE c-MYC.

par

JEAN-FRANÇOIS NAUD

Département de microbiologie et d'infectiologie

Thèse présentée à la faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade

de philosophiae doctor (Ph.D.)

AOÛT 2006



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-30968-1*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-30968-1*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

## RÉSUMÉ

### ANALYSE STRUCTURALE ET THERMODYNAMIQUE DE L'HOMODIMÉRISATION DE MAX ET DE SON EFFET TRANSCRIPTIONNEL SUR LES GÈNES CIBLES DE c-MYC.

par JEAN-FRANÇOIS NAUD

L'oncoprotéine c-Myc joue un rôle clé dans la croissance et la prolifération cellulaire des cellules normales et contribue à la tumorigénèse des cellules cancéreuses. La reconnaissance moléculaire entre c-Myc et Max est une condition obligatoire pour les activités cellulaires de c-Myc. Max est aussi le partenaire obligatoire des protéines de la famille Mad qui ont une activité antagoniste sur c-Myc en compétitionnant pour Max. De plus, Max peut aussi former un homodimère via son domaine b-HLH-LZ. Tous ces hétérodimères ainsi que l'homodimère de Max peuvent lier une séquence d'ADN spécifique (E-Box) dans les promoteurs de gènes cibles. Jusqu'à maintenant aucun rôle précis n'a été déterminé pour l'homodimère de Max. Cependant, il a été démontré récemment que l'expression de Max corrèle avec le degré de différenciation des cellules épithéliales de l'intestin et est régulée à la hausse par le TGF- $\beta$ . Ces observations suggèrent un rôle pour Max dans la répression de la transcription de gènes cibles de c-Myc impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire. Nonobstant ces informations, puisque aucune caractérisation *in vitro* de la protéine n'a été effectuée jusqu'à maintenant, la formation de l'homodimère *in vivo* demeure incertaine. La thèse présentée ici décrit la caractérisation structurale, thermodynamique et fonctionnelle de la protéine p21 Max et de son domaine b-HLH-LZ. Nos résultats montrent que le  $K_D$  de Max est de  $7 \cdot 10^{-6}$ , ce qui est inférieur au  $K_D$  du domaine b-HLH-LZ seul et que seulement le domaine HLH-LZ est replié en absence d'ADN. La caractérisation de la protéine complète indique aussi que la plus grande stabilité semble être d'origine électrostatique. Étant donné que les concentrations basales de Max sont dans l'ordre du micromolaire, nos résultats suggèrent que le dimère de Max pourrait se former *in vivo* et lier l'ADN. De plus, nous montrons que l'expression de Max mène à la répression de l'activité transcriptionnelle du promoteur hTERT, un gène cible de c-Myc. Nos résultats sont en accord avec un rôle pour l'homodimère Max dans la répression de l'activation de la transcription en déplaçant l'hétérodimère c-Myc/Max des promoteurs des gènes cibles. De plus, avec comme objectif d'augmenter cette inhibition de la transcription par Max, nous avons augmenté la stabilité de la protéine en mutant seulement deux résidus d'acides aminés très importants pour la déstabilisation de l'homodimère Max et pour la reconnaissance moléculaire spécifique entre c-Myc et Max localisés à l'interface de dimérisation du domaine leucine zipper. La caractérisation de la stabilisation amenée par cette double mutation a été effectuée tant sur le domaine b-HLH-LZ que sur la protéine complète. Les résultats nous indiquent que la double mutation stabilise grandement l'homodimère de Max mais que malgré cette plus grande stabilité, l'homodimère est incapable d'inhiber plus efficacement la transcription de gènes de prolifération activés par c-Myc.

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES .....	ii
LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES PUBLICATIONS .....	x
LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....	xi
RÉSUMÉ .....	xvii
Introduction.....	1
1 Le réseau c-Myc/Max/Mad et le cancer .....	1
1.1 FONCTIONS CELLULAIRES DES HÉTÉRODIMÈRES MYC/MAX.....	6
1.1.1 c-Myc comme facteur de transcription .....	7
1.1.1.1 Mécanisme d'activation.....	8
1.1.1.2 Mécanismes de répression .....	16
1.1.2 Dérégulation de Myc dans les tumeurs .....	20
1.2 FONCTIONS CELLULAIRES DES HÉTÉRODIMÈRES MAD/MAX .....	26
1.2.1 Mad I comme facteur de transcription .....	27
1.2.2 Dérégulation de Mad I dans les tumeurs.....	28
1.3 FONCTIONS CELLULAIRES DE L'HOMODIMÈRE MAX.....	31
1.3.1 Caractérisation de la protéine Max .....	31
1.3.2 Caractéristiques structurales du b-HLH de Max.....	32
1.3.3 Caractéristiques structurales du domaine leucine zipper .....	33
1.4 DÉTERMINANTS STRUCTURAUX À L'INTÉRIEUR DU RÉSEAU C-MYC/MAX/MAD .....	37



1.4.1 Déterminants structuraux du domaine LZ de Max régissant la réversibilité de l'homodimérisation et de l'hétérodimérisation avec les familles Myc et Mad.....	37
1.4.2 Déterminants structuraux des domaines LZ de l'hétérodimère c-Myc/Max....	40
1.4.3 Déterminants structuraux des domaines LZ de l'hétérodimère MadI/Max .....	45
1.5 OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE .....	46
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	50
2.1 CLONAGE ET MUTAGÉNÈSE .....	50
2.1.1 Clonage du b-HLH-LZ de Max dans le vecteur d'expression procaryote pET3a.....	50
2.1.2 Mutagenèse dirigée pour obtenir la double mutation N69V-H72L dans le LZ de Max*. .....	51
2.1.3 Addition des acides aminés GSGC en C-terminal du b-HLH-LZ de Max* et Max*VL.....	52
2.1.4 Mutagenèse dirigée pour obtenir la mutation C87G située en C-terminal de Max* et Max*VL dans le vecteur pET3a. ....	53
2.1.5 Clonage de p21 Max dans le vecteur pET3a. ....	54
2.1.6 Mutagenèse dirigée pour obtenir la double mutation N69V-H72L dans le LZ de p21 Max.....	54
2.1.7 Clonage de HA Max dans pCDNA3.1 .....	56
2.1.8 Clonage de HA Max VL dans pCDNA3.1 .....	57
2.1.9 Isolation de l'ADN plasmidique par miniprep. ....	58
2.2 EXPRESSION ET PURIFICATION .....	59

2.2.1 Transformation plasmidiques dans les bactéries DH5 $\alpha$ , XL1-Blue et BL21 DE3 pLysS. ....	59
2.2.2 Maxi-Prep par gradient de chlorure de césium.....	60
2.2.3 Expression des protéines recombinantes (Max*, Max*VL, p21 Max, p21 Max VL).....	61
2.2.4 Purification de Max* et Max*VL.....	62
2.2.5 Purification de p21 Max et p21 Max VL .....	63
2.3 VÉRIFICATION DES CLONES ET DES PROTÉINES OBTENUES .....	64
2.3.1 Séquençage des clones obtenus .....	64
2.3.2 Spectrométrie de masse .....	65
2.4 ANALYSE STRUCTURALE ET THERMODYNAMIQUE DES PROTÉINES OBTENUES.....	65
2.4.1 Détermination de structure secondaire et tertiaire par dichroïsme circulaire...	69
2.4.2 Dénaturation thermique suivie par dichroïsme circulaire .....	70
2.4.3 Détermination des paramètres thermodynamiques par simulation des dénaturations thermiques .....	71
2.4.4 Ultracentrifugation différentielle .....	77
2.4.5 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	78
2.4.6 Modelage moléculaire.....	79
2.5 ANALYSE DE L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DE P21 MAX ET P21 MAX VL SUR LE PROMOTEUR DE HTERT.....	80
2.5.1 Conditions de culture cellulaire .....	80
2.5.2 Transfections cellulaires.....	80

2.5.2.1 Transfections stables au DOSPER des cellules EcR 293 avec le vecteur pIND .....	80
2.5.2.2 Transfections transitoires au PEI des cellules EcR 293, HT-1080 et HCT-116 avec les vecteurs pGL2, pGL2-hTERT, pCDNA3.1 et pEGFP .....	82
2.5.3 Induction de l'expression de Max WT et Max VL dans les EcR 293 .....	83
2.5.4 Essais Luciférase.....	83
2.5.5 Dosage de protéines .....	84
2.5.6 Immunobuvardage de type western .....	85
2.5.7. Localisation cellulaire de c-Myc, p21 Max et p21 Max VL par immunofluorescence.....	86
2.5.8 Mesure de l'activité télomérase par essais TRAP .....	87
RÉSULTATS.....	90
3.1 L'AUGMENTATION DE LA STABILITÉ DU LEUCINE ZIPPER DE MAX AUGMENTE LA STABILITÉ DU COMPLEXE B-HLH-LZ : E-BOX .....	90
3.2 CARACTÉRISATION STRUCTURALE ET THERMODYNAMIQUE DU PRODUIT DE GÈNE COMPLET DE P21 MAX .....	147
3.3 INHIBITION SPÉCIFIQUE DE L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DE L'HÉTÉRODIMÈRE C-MYC/MAX : INGÉNIERIE PROTÉIQUE D'UN MUTANT DE MAX THERMOSTABLE EMPÊCHANT LA RECONNAISSANCE MOLÉCULAIRE ENTRE C-MYC ET MAX.....	204
3.3.1 Effet de la surexpression de Max WT et Max VL sur l'activité du promoteur de hTERT dans les cellules HCT-116 et HT-1080. ....	204

3.3.2 Localisation cellulaire de Max WT, Max VL et c-Myc dans les cellules HCT-116 et HT-1080. ....	212
3.3.3 Localisation de c-Myc et effet sur l'activité du promoteur de hTERT lors de la surexpression de c-Myc dans les cellules HT-1080. ....	213
3.3.4 Effet de la surexpression de Max WT et Max VL sur l'activité télomérase endogène dans les cellules EcR 293. ....	217
DISCUSSION .....	224
CONCLUSION .....	<b>233</b>
PERSPECTIVES .....	237
REMERCIEMENTS .....	239
RÉFÉRENCES.....	240

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation en ruban du domaine b-HLH-LZ de l'homodimère de Max lié à l'ADN .....	3
Figure 2: Diagramme montrant le réseau c-Myc/Max/Mad ses effets cellulaires .....	5
Figure 3: Représentations schématiques de c-Myc et identification de certaines protéines interagissant avec ses différents domaines .....	10
Figure 4: Schéma résumant l'activation de la transcription par l'hétérodimère c-Myc/Max.....	11
Figure 5: Modifications possibles sur les histones composant le nucléosome .....	15
Figure 6: Schéma représentant les deux modèles avancés par lesquels Myc pourrait inhiber la transcription des gènes cytotostatiques.....	17
Figure 7: Représentation du cycle cellulaire et de quelques points de contrôle .....	18
Figure 8: Résistance au TGF- $\beta$ dans une cellule tumorale.....	19
Figure 9: Régulation de la stabilité de c-Myc par Ras .....	22
Figure 10: Régulation des gènes cibles de c-Myc par les protéines FOXO .....	24
Figure 11: Régulation de l'activité de Miz-1 par Ras .....	25
Figure 12: Schéma résumant l'inhibition de la transcription par l'hétérodimère Mad I/Max. ....	29
Figure 13: Réponse au TGF- $\beta$ .....	30
Figure 14: Structure du b-HLH-LZ de Max en solution déterminée par RMN.....	34

Figure 15: Représentation sous forme de roues hélicales des deux hélices $\alpha$ formant le domaine leucine zipper.....	35
Figure 16: Représentation sous forme de roues hélicales des deux hélices $\alpha$ formant le domaine leucine zipper de l'homodimère Max .....	38
Figure 17: Représentation de la surface moléculaire des deux hélices $\alpha$ formant le domaine leucine zipper de l'homodimère de Max.....	39
Figure 18: Alignement de séquence en acides aminés des différentes protéines hétérodimérisant avec Max.....	41
Figure 19: Représentation sous forme de roues hélicales des deux hélices $\alpha$ formant le domaine leucine zipper de l'hétérodimère c-Myc/Max.....	42
Figure 20: Représentation de la surface moléculaire des deux hélices $\alpha$ formant le domaine leucine zipper de l'hétérodimère c-Myc/Max.....	43
Figure 21: Représentation du pont salin tel que caractérisé lors de la détermination de la structure en solution du leucine de l'hétérodimère c-Myc/Max .....	44
Figure 22: Principaux objectifs du projet de recherche.....	49
Figure 23: Spectres de dichroïsme circulaire de différentes structures secondaires pures....	66
Figure 24: Diagramme montrant les deux états d'une protéine lors de la dénaturation thermique .....	73
Figure 25: Protocole d'amplification de répétitions télomériques .....	89
Figure 26: Essais luciférase sur le promoteur hTERT .....	207
Figure 27: Immunobuvardage de type western de c-Myc et Max dans les cellules HCT-116.....	209

Figure 28: Cinétique d'inhibition du promoteur de hTERT à différents temps post-transfection.....	211
Figure 29: Localisation de Max WT, Max VL et c-Myc dans les cellules HCT-116.....	215
Figure 30: Localisation de Max WT, Max VL et c-Myc dans les cellules HT-1080 .....	216
Figure 31: Localisation de EGFP et MycEGFP dans les cellules HT-1080.....	218
Figure 32: Essais luciférase sur le promoteur hTERT dans les cellules HT-1080 .....	219
Figure 33: Détection de l'induction des protéines Max recombinantes par immunobuvardage de type western.....	220
Figure 34: Inhibition de l'activité télomérase analysée par essai TRAP lors de la surexpression de Max .....	222
Figure 35: Résumé des objectifs et des résultats obtenus de l'étude présentée dans cette thèse.....	236

## LISTE DES PUBLICATIONS

NAUD JF, GAGNON F, WELLINGER R, CHABOT B, LAVIGNE P (2003) Improving the thermodynamic stability of the leucine zipper of max increases the stability of its b-HLH-LZ:E-box complex, J Mol Biol. 326, 1577-95. ....90

NAUD JF, MCDUFF FO, SAUVE S, MONTAGNE M, WEBB BA, SMITH SP, CHABOT B, LAVIGNE P. (2005) Structural and thermodynamical characterization of the complete p21 gene product of Max, Biochemistry 44, 12746-58.....147



## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

Akt : protéine kinase B (PKB)

ARF : « auxin response factor »

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine tri-phosphate

BAF53 : « BRG1/brm-associated factor of 53 KDa »

b-HLH-LZ : domaine « basic Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper »

BSA : « bovine serum albumin »

cad : « carbamyl-P synthetase/aspartate transcarbamylase/dihydroorotase »

CD : dichroïsme circulaire

cdc25A : « cell division cycle 25A »

CDK : « cyclin-dependant kinase »

CHAPS : « 3[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-propanesulfonic acid »

c-Myc : Myc cellulaire

CO<sub>2</sub> : oxyde de carbone

Cp : capacité calorifique

CpG : séquence d'ADN avec une fréquence élevée de cytosine et guanine

CTD : « C-terminal domain »

CsCl : chlorure de césium

dATP : déoxy adénosine triphosphate

dCTP : déoxy cytosine triphosphate

dGTP : déoxy guanosine triphosphate

DMEM : « Dulbecco's Modified Eagle's Medium »

dNTP : déoxy N triphosphate

Dnmt3a : « DNA méthyltransférase 3a »

D.O.<sub>600nm</sub> : densité optique à 600 nm

dT : différence de température

DTT : dithiothreitol

dTTP : déoxy thymidine triphosphate

D<sub>2</sub>O : oxide de deutérium

EDTA : « ethylenediaminetetraacetic acid »

EGFP : « enhanced green fluorescent protein »

EGTA : « ethylene glycol tetraacetic acid »

EMEM : « Earle's minimal essential medium »

ERK : « extracellular signal-regulated kinase »

ESI : « electrospray ionisation »

E2F4/5 : facteur de transcription E2F

FBS : « foetal bovine serum »

FITC : « fluorescein-5-isothiocyanate »

FOXO : « forkhead transcription factors class O »

gas1 : « growth-arrest-specific »

GCN5 : « General control of Amino acid synthesis 5 »

GCN4 : « general control of Amino acid synthesis 4 »

GSGC : glycine-serine-glycine-cystéine

GSK-3 : « Glycogen Synthase Kinase 3 »

G1 : « GAP 1 »

G2 : « GAP 2 »

H : enthalpie

HCOOH : acide formique

HAT : histone acétyl transférase

HDAC : histone deacétylase

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-TROSY : « heteronuclear single quantum correlation-transverse relaxation optimized spectroscopy »

H2A : histone 2A

H3 : histone

H3K4Me : Histone H3 lysine 4 méthylé

H3K79Me : Histone H3 lysine 79 méthylé

H3K9Ac : Histone H3 lysine9 acétylé

H3K14Ac : Histone H3 lysine 14 acétylé

H3K18Ac : Histone H3 lysine 18 acétylé

I : intermédiaire

Id2 : « inhibitor of DNA binding 2 »

INI1/hSNF5 : composants du complexe SWI/SNF humain

IPTG : « isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside »

hTERT : « human telomerase reverse transcriptase »

KCl : « chlorure de potassium »

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  : phosphate de potassium monobasique

$K_2HPO_4$  : phosphate de potassium dibasique

K: Kelvin

kcal: kilocalorie

LB : Luria Broth

M : Mitotique

Mad : « Max associated protein in differentiation »

MALDI-TOF : « Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight »

MAP : « mitogen-activated protein »

Max: « Myc associated protein X »

MB : « Myc boxe »

MBI : « Myc boxe I»

MBII : « Myc boxe II»

MBIII : « Myc boxe III»

$MgCl_2$  : « chlorure de magnésium »

Miz-1 : « Myc interacting zinc finger protein 1 »

Myc : oncogène de la myélocytomatose

N : natif

$NaCl$  : chlorure de sodium

$NaN_3$  : azide de sodium

$NaOH$  : hydroxide de sodium

NF-Y : « nuclear factor Y »

$NH_4Cl$  : chlorure d'ammonium

NP-40 : Nonidet P-40

Odc : ornithine décarboxylase

ORC1 : « origin recognition complex 1 protein »

PBS : « phosphate buffer solution »

PCR : « polymerase chain reaction »

PEI : Polyethylenimine

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

P-TEFb : « positive transcription elongation factor b »

P: population

Ras : « rat sarcoma »

RMN : résonance magnétique nucléaire

RNase : enzyme dégradant l'acide ribonucléique

S : synthèse

S : entropie

SCF<sup>SBW7</sup> : protéine « Skp1/Cullin/F-box »

SDS : « sodium dodecyl sulfate »

Ser62 : serine 62

SID : « Sin3 interacting domain »

SKP2 : « S-phase kinase-associated protein 2 »

SMAD : « mothers against DPP homolog »

SWI/SNF : « complexe de remodelage de la chromatine composé des gènes SWI et SNF »

Swrl : facteur échangeur d'histone

T: température

T° : température de dénaturation

TB : « terrific broth »

TBS : « tris buffer saline »

TFII-I : « transcription initiation factor II-I »

TGF-β: « transforming growth factor β »

Thr58 : thréonine 58

TIP48 : «TATA Box-binding protein-interacting protein, 48-kDa »

TIP49 : «TATA Box-binding protein-interacting protein, 49-kDa »

TIP60 : « TATA Box-binding protein-interacting protein, 60-kDa »

TRAP : « telomeric repeat amplification protocol »

TRRAP : «transformation/transcription domain-associated protein »

U : « unfolded »

UTR : « untraslated region »

VEGF : «vascular endothelial growth factor »

[Θ]: ellipticité

# INTRODUCTION

## 1. Le réseau c-Myc/Max/Mad et le cancer.

L'homéostasie de l'organisme requiert que les cellules croissent, prolifèrent, migrent ou meurent par apoptose selon les besoins. Ces processus sont contrôlés et orchestrés par l'expression et la coopération de différentes protéines. Une dérégulation de la transcription peut menacer cette homéostasie et l'intégrité de l'organisme entier. En effet, lorsqu'il y a activation de proto-oncogènes, qui sont souvent des facteurs de transcription, ou inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs, la conséquence peut être une transformation cellulaire, une croissance néoplasique et potentiellement la formation de tumeurs menaçant la survie de l'organisme entier (ROTTMANN et LUSCHER, 2006). Les protéines de la famille Myc sont parmi les premiers proto-oncogènes qui ont été identifiés. Ces protéines sont des facteurs de transcription capable d'activer l'expression de plusieurs gènes. La dérégulation de leur expression est souvent associée à la croissance néoplasique et la transformation cellulaire (RAMSAY *et al.*, 1982). Même si ces découvertes ont été effectuées au début de la caractérisation des protéines Myc, le mécanisme précis par lequel les protéines Myc favorisent la perte du contrôle du comportement cellulaire à l'intérieur de l'organisme est demeuré mal connu pendant plusieurs années (PRENDERGAST *et al.*, 1989).

Nos connaissances sur les fonctions cellulaires et moléculaires des protéines Myc permettant la prolifération cellulaire se sont grandement améliorées au cours des dernières années (PRENDERGAST *et al.*, 1989; LANDSCHULZ *et al.*, 1988; MURRE *et al.*, 1989). Une découverte importante fut celle de la protéine Max en 1991. Max interagit avec c-Myc, lui permet de lier l'ADN et d'effectuer ses fonctions d'activateur de transcription (BLACKWOOD et EISENMAN, 1991). Comme c-Myc, l'une des caractéristiques de Max est la présence d'un domaine b-HLH-LZ (région basique, motif « **Helix-Loop-Helix** » et motif « **Leucine Zipper** »). Ce domaine possède 2 fonctions : il régit l'interaction entre les protéines du réseau Myc/Max/Mad et il permet la liaison à l'ADN (BLACKWOOD et EISENMAN, 1991; BLACKWOOD *et al.*, 1992; AYER *et al.*, 1993; HURLIN *et al.*, 1996; ZERVOS *et al.*, 1993). Pour activer ou réprimer la transcription des gènes cibles, les protéines c-Myc et Mad I doivent respectivement hétérodimériser avec la protéine Max. Les hétérodimères Mad I/Max possèdent des rôles opposés aux hétérodimères Myc/Max qualifiant ainsi les protéines de la famille Mad comme étant des antagonistes cellulaires des protéines de la famille Myc (AYER *et al.*, 1993). Puisque Max est essentiel pour les fonctions cellulaires de Mad et Myc, cette protéine a été impliquée, jusqu'à ce jour, dans la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et l'apoptose, mais seulement à titre de partenaire. Max peut aussi former un homodimère, mais les fonctions cellulaires de cet homodimère demeurent encore mal définies (figure 1) et la recherche des fonctions cellulaires potentielles de l'homodimère Max *in vivo* n'a été qu'effleurée.



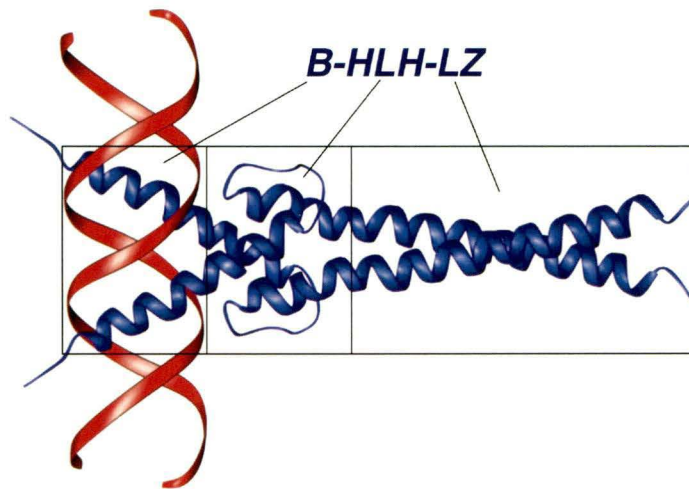


Figure 1 : Représentation en ruban du domaine b-HLH-LZ de l'homodimère de Max lié à l'ADN (1AN2.pdb : Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/>) (FERRE D'AMARE *et al.*, 1993).

Les protéines Myc font donc partie d'un groupe de protéines identifiées comme le réseau Myc/Max/Mad. Il est maintenant clairement démontré que ce réseau agit comme régulateur de la transcription d'un très grand nombre de gènes (AMATI *et al.*, 2001; GRANDORI *et al.*, 2000; LUSCHER, 2001; LUTZ *et al.*, 2002; OSTER *et al.*, 2002). Parmi ces gènes, il y a la *cycline D2* (BOUCHARD *et al.*, 2001), l'*odc* (TOBIAS *et al.*, 1995), *hTERT* (KYO *et al.*, 2000), *p21<sup>Cip1</sup>* (WU *et al.*, 2003) et *p15<sup>INK4b</sup>* (STALLER *et al.*, 2001). Plusieurs des gènes cibles de ce réseau sont impliqués dans le contrôle de la croissance, de la prolifération, de la différenciation cellulaire et de l'apoptose mais aussi dans différents aspects de la tumorigénèse (figure 2) (ROTTMANN et LUSCHER, 2006). L'association entre les différents membres du réseau permet la liaison à une séquence d'ADN spécifique permettant aux hétérodimères formés d'exécuter leur activité sur la transcription (BLACKWOOD et EISENMAN, 1991; BLACKWOOD *et al.*, 1992; AYER *et al.*, 1993). Il est donc très important de connaître les différents déterminants structuraux qui dictent la reconnaissance moléculaire entre les protéines du réseau c-Myc/Max/Mad et leur liaison à l'ADN puisque la capacité de régulation de la transcription provient en majeure partie des différents domaines présents sur les protéines s'associant à Max. (AYER *et al.*, 1995; MCMAHON *et al.*, 2000). Comme mentionné ci-haut, la dimérisation des protéines du réseau c-Myc/Max/Mad est due au domaine b-HLH-LZ. Par conséquent, les déterminants structuraux importants pour cette dimérisation résident à l'intérieur de ce domaine. C'est aussi à cause des déterminants structuraux du domaine b-HLH-LZ que Max est un partenaire obligatoire des protéines du réseau puisque celles-ci ne peuvent former d'homodimères et lier l'ADN qu'en interagissant avec Max.

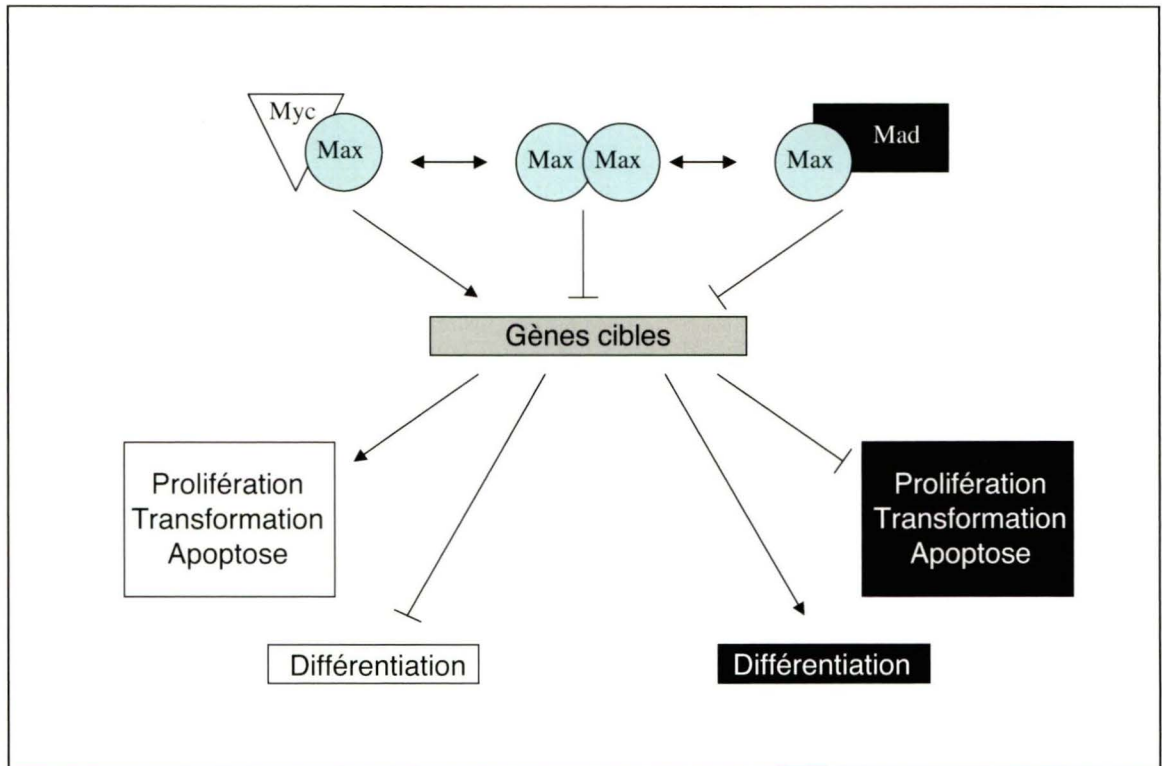


Figure 2 : Diagramme montrant le réseau c-Myc/Max/Mad et l'effet des différents complexes sur la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose. Les effets de l'hétérodimère c-Myc/Max sont représentés en blanc tandis que ceux de l'hétérodimère Mad/Max le sont en noir. Les flèches représentent une régulation positive et les barres représentent une régulation négative.

Puisque la dérégulation de Myc est retrouvée dans 50% des cancers hépatocellulaires, 70% des cancers du côlon, 80% des cancers du sein et 90% des cancers gynécologiques (GARDNER, L., *et al.*, 2002), l'inhibition des fonctions cellulaires de c-Myc pourraient être une voie anti-cancer intéressante. Ces solutions pourraient découler d'une meilleure compréhension des différents déterminants structuraux menant à la reconnaissance moléculaire des différents membres du réseau. Nous croyons qu'une étude dirigée sur les déterminants structuraux déstabilisateurs de l'homodimère Max serait utile dans ce sens puisque qu'il a déjà été montré que la surexpression de Max peut arrêter la croissance de lignées cellulaires lymphoblastiques (GU *et al.*, 1993). De plus, récemment, il a été observé que le niveau d'expression de Max pouvait être modulé selon l'axe crypto-villus de l'épithélium intestinal et/ou lors de la réponse au TGF- $\beta$  (MARIADASON *et al.*, 2005; SIEGEL *et al.*, 2003). La présente thèse a pour but de mieux caractériser ces déterminants structuraux pour développer une molécule Max mutante capable de contrer l'activité de l'hétérodimère c-Myc/Max. La surexpression de ce Max mutant, dans une lignée de cellules intestinales cancéreuses surexprimant c-Myc, pourrait interférer avec ses fonctions transcriptionnelles et ainsi mener potentiellement à l'arrêt de la prolifération cellulaire.

### **1.1 Fonctions cellulaires des hétérodimères Myc/Max**

Plusieurs raisons expliquent pourquoi les protéines de la famille Myc sont étudiées depuis plusieurs années. Une de celles-ci est probablement la grande quantité de processus

biologiques dans lesquels ces protéines sont impliquées incluant la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et la tumorigénèse (PELENGARIS et KHAN, 2003). Les rôles de Myc se situent donc dans deux catégories ou comportements cellulaires distincts, ceux qui sont à l'intérieur d'une cellule saine et ensuite ceux qui sont dans une cellule cancéreuse.

### **1.1.1 c-Myc comme facteur de transcription.**

Les différents rôles cellulaires de c-Myc semblent donc passer par la régulation de la transcription de ses différents gènes cibles, mais ses fonctions physiologiques et biochimiques sont encore mal comprises. Plusieurs gènes cibles ont été identifiés comme étant potentiellement régulés par c-Myc (WATERS *et al.*, 1991; BOYD *et al.*, 1998; BOUCHARD *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2003; FERNANDEZ *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2004). De plus, pour ajouter à la complexité de ce facteur de transcription, c-Myc peut activer et/ou réprimer la transcription. Comme mentionné plus loin, c-Myc est impliqué dans la progression du cycle cellulaire et plusieurs gènes cibles ont été identifiés comme jouant un rôle critique dans cette progression. En effet, Myc active les gènes qui sont impliqués dans la croissance cellulaire et inhibe l'expression des gènes cytostatiques impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire. Parmi les gènes cibles de c-Myc qui sont activés, nous retrouvons *cdc25A* (GALAKTIONOV *et al.*, 1996), la *cycline D2* (BOUCHARD *et al.*, 2001), *odc* (TOBIAS *et al.*, 1995), *cad* (MILTENBERGER *et al.*, 1995), *Id2* (LASORELLA *et al.*, 2000) et *hTERT* (KYO *et al.*, 2000). Les gènes réprimés par c-

Myc incluent  $p27^{Kip1}$  (YANG *et al.*, 2001),  $p21^{Cip1}$  (WU *et al.*, 2003),  $p15^{INK4b}$  (STALLER *et al.*, 2001) et *gas1* (LEE *et al.*, 1997). Parmi les gènes activés par c-Myc, nous avons mentionné hTERT. Cette protéine est la sous-unité catalytique de la télomérase et la modulation de son expression est en relation directe avec son activité (KYO *et al.*, 2000). Tout comme Myc, la télomérase est exprimée dans plusieurs cancers et est exprimée transitoirement pendant la phase S dans la majorité des cellules somatiques (MASUTOMI *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 1994). L'activation de la télomérase est importante pour le maintien de la croissance de la cellule tumorale (HARLEY, 2002). Puisque l'expression de hTERT est modulée par Myc et que son promoteur est bien caractérisé, hTERT sera utilisé ici pour caractériser l'effet de Max sur la transcription.

#### 1.1.1.1 Mécanisme d'activation

Lors de la caractérisation des différents éléments essentiels à ses fonctions de facteur de transcription, trois régions hautement conservées entre les différentes protéines de la famille Myc (v-Myc, N-Myc, L-Myc, c-Myc) situées en N-terminal de c-Myc ont été identifiées et nommées « **Myc Box** » ou MB (figure 3). Le domaine MBI a été identifié comme le domaine responsable de la régulation de dégradation c-Myc (BAHRAM *et al.*, 2000). Le domaine MBIII régule lui aussi la stabilité de la protéine, mais est aussi essentiel aux fonctions cellulaires de c-Myc *in vivo*. De plus, ce domaine semble requis pour l'activation et la répression complètes de la transcription de plusieurs gènes cibles (HERBST *et al.*, 2005; HERBST *et al.*, 2004). Le domaine MBII est le domaine qui a

retenu le plus l'attention puisqu'il est essentiel à toutes les fonctions biologiques de c-Myc (COHEN et PROCHOWNIK, 2006). Le domaine MBII n'est cependant pas impliqué dans l'hétérodimérisation avec Max et même s'il est requis pour l'activation ou la répression de la majorité des gènes cibles, il ne l'est pas pour tous (ADHIKARY et EILERS, 2005). Le domaine MBII peut lier ou recruter plusieurs protéines dont quatre ont été mieux caractérisées: TRRAP (MCMAHON *et al.*, 1998), TIP48, TIP49 (MCMAHON *et al.*, 2000) et SKP2 (KIM *et al.*, 2003; VON DER LEHR *et al.*, 2003) (figure 4). Pour activer la transcription des différents gènes cibles, trois mécanismes sont actuellement proposés : l'acétylation des histones (PARK *et al.*, 2001), le remodelage de la chromatine (PARK *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2003) et la libération du promoteur par le recrutement d'une kinase, pTEF-b, qui peut phosphoryler la queue C-terminale de l'ARN polymérase II (EBERHARDY et FARNHAM, 2002). Ces différents mécanismes s'expliquent en majeure partie par les protéines recrutées par c-Myc ou interagissant avec lui.

Le premier mécanisme nécessite le recrutement de la protéine TRRAP. Cette protéine est une sous-unité principale des complexes histones acétyle transférase (HAT) TIP60 et GCN5 (PARK *et al.*, 2001). L'intégrité du domaine MBII de c-Myc est essentielle pour le recrutement de TRRAP et pour l'activité HAT aux promoteurs des gènes cibles (figure 4). TRRAP fait aussi partie d'un complexe contenant la protéine p400 (FUCHS *et al.*, 2001).

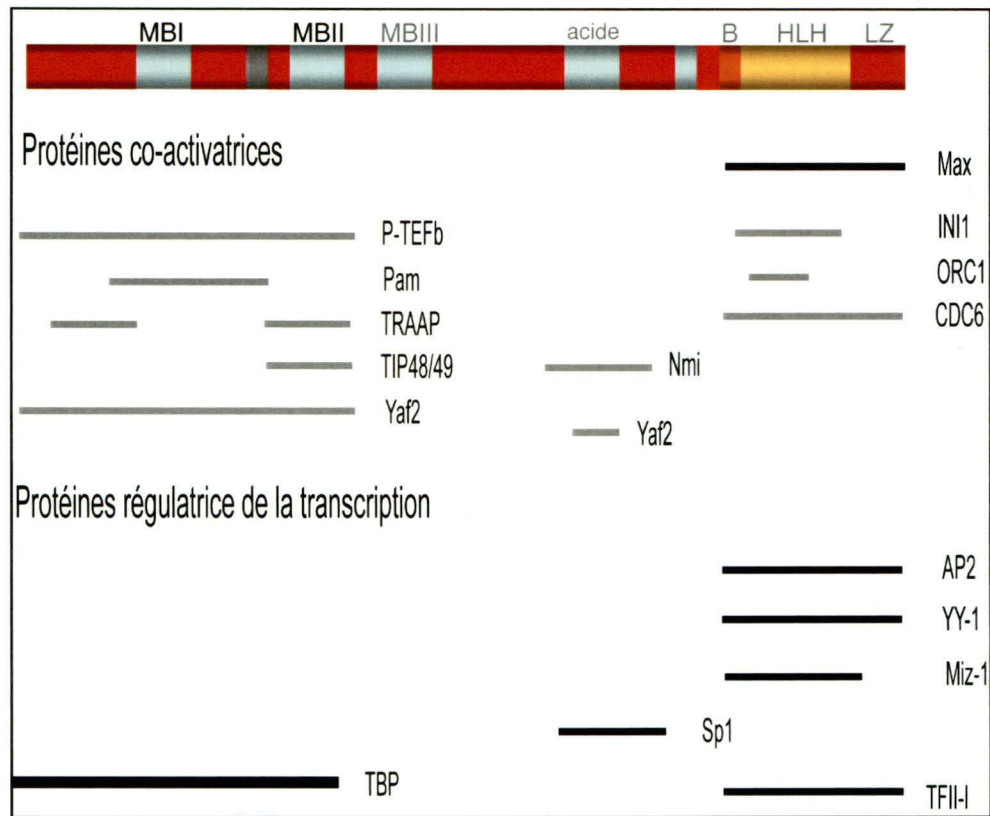


Figure 3 : Représentations schématiques de c-Myc et identification de certaines protéines interagissant avec ses différents domaines. Les domaines MBI et MBII ainsi que les régions comprises entre ces domaines forment le domaine responsable de l'activation de la transcription, le domaine MBIII est impliqué dans la stabilité de la protéine tandis que le domaine b-HLH-LZ est responsable de l'hétérodimérisation avec Max et de la liaison des sites E-Box dans les promoteurs des gènes activés par c-Myc. Le domaine b-HLH-LZ de c-Myc est aussi important pour l'interaction avec Miz-1 lors de la répression de la transcription de certains gènes cytotatiques.



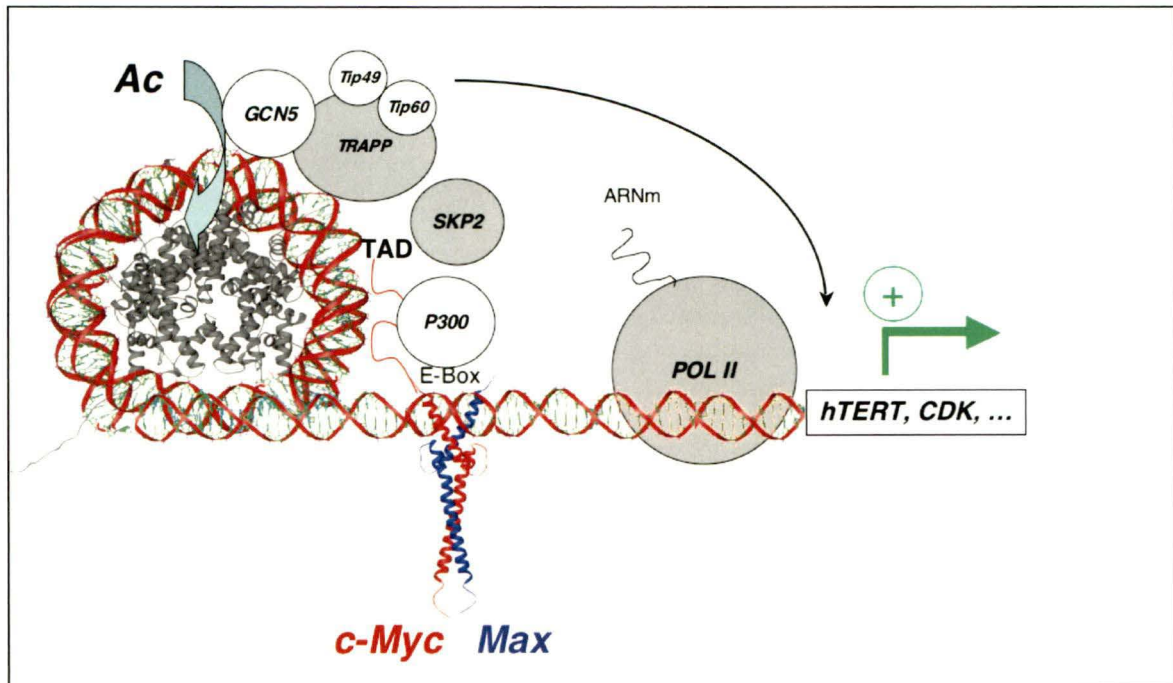


Figure 4 : Schéma résumant l'activation de la transcription par l'hétérodimère c-Myc/Max. L'hétérodimère lie une séquence d'ADN nommée E-Box (CACGTG) située à l'intérieur des promoteurs des gènes cibles et recrute des protéines co-activateuses. Parmi les fonctions de ces co-activateurs, ceux-ci possèdent une activité histone acétyltransférase et peuvent acétyler les histones pour ainsi permettre l'ouverture de la chromatine et la transcription des gènes.

Ce complexe peut être recruté par c-Myc, mais il ne possède pas d'activité HAT, ce qui semble indiquer que le complexe c-Myc/TRRAP posséderait d'autres rôles dont celui d'échanger des histones, en particulier les histones H2A. En effet, les homologues de p400 chez la drosophile (Domino) et la levure (Swr1) sont des facteurs échangeurs d'histones (KUSCH *et al.*, 2004; KOBOR *et al.*, 2004). La protéine Swr1 par exemple est la sous-unité ATPase du complexe SWR1. Ce complexe peut briser les interactions entre les histones et ainsi affecter l'intégrité de l'octamère d'histones constituant le nucléosome. SWR1 échange le dimère H2A-H2B pour le dimère H2A.Z-H2B. Cet échange requiert la sous-unité Swr1 et est dépendant de l'ATP (KORBER et HORZ, 2004). Quant aux fonctions de H2A.Z, elles semblent être multiples mais peuvent être résumées dans le maintien de l'ouverture de la chromatine, dans l'induction de la transcription et dans le maintien des fonctions du centromère (RAISNER et MADHANI, 2006). Ceci indique donc que l'acétylation des histones et l'échange d'histones pourraient fonctionner dans la même voie.

Le second mécanisme d'activation de la transcription qui consiste à remodeler la chromatine pourrait donc être intimement relié au premier. Pour remodeler la chromatine, c-Myc recrute des complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendant comme SWI/SNF. La partie C-terminale de c-Myc interagit avec le complexe INI1/hSNF5, une composante essentielle du complexe SWI/SNF (CHENG *et al.*, 1999). De plus, l'activation de la transcription est diminuée lorsqu'il y a une compétition entre SWISNF et la protéine ORC1 pour la partie C-terminale de c-Myc (TAKAYAMA *et al.*, 2000). Récemment, une autre protéine interagissant avec c-Myc, BAF53, a été identifiée (PARK

*et al.*, 2002). BAF53 est elle aussi une composante intégrale du complexe SWI/SNF (LEE *et al.*, 2003). Finalement, il a été avancé récemment que les complexes qui interagissent avec c-Myc pourraient contribuer à la reconnaissance de la chromatine en permettant la liaison aux sites E-Box de l'euchromatine. L'observation qui a mené à cette hypothèse est que la méthylation (H3K4Me/H3K79me) et l'acétylation de l'histone H3, qui sont normalement associées à l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription (PIC), sont un pré-requis pour la reconnaissance de l'ADN par Myc. Cependant, il est peu probable que Myc lui-même soit responsable de la reconnaissance du code des histones (figure 5) puisque ces marquages sont normalement reconnus par des motifs spécialisés (chromo-, bromodomaines et autres). Ces motifs se retrouvent normalement dans des protéines appartenant à de gros complexes, incluant les complexes de remodelage de la chromatine. (GUCCIONE *et al.*, 2006)

D'autres études montrent aussi l'importance des complexes de remodelage de la chromatine sur l'activation de la transcription par Myc. Les protéines TIP48 et TIP49 qui sont retrouvées dans le complexe TIP60 peuvent lier le domaine MBII indépendamment de TRRAP. Ces deux protéines sont des ATPases hexamériques hautement conservées (MCMAHON *et al.*, 2000). Une mutation qui abolit l'activité ATPase de TIP49 a été montrée efficace à inhiber la transformation cellulaire par Myc probablement en augmentant l'apoptose induite par Myc indiquant par le fait même que l'interaction entre Myc et TIP49 a une importance biologique. De plus, une étude récente réalisée avec les homologues de TIP48 et TIP49 chez *Xenopus* a montré que ces deux protéines sont

impliquées dans la répression de la transcription par le complexe Myc-Miz1 (ETARD *et al.*, 2005).

Le troisième mécanisme d'activation, l'initiation de la transcription par la phosphorylation de la queue C-terminale de l'ARN polymérase II, a surtout été étudié avec le promoteur du gène *cadI* (EBERHARDY et FARNHAM, 2002). Le promoteur de ce gène n'a pas un niveau d'acétylation plus élevé lorsqu'il est activé par c-Myc (EBERHARDY *et al.*, 2000). De plus, il semble que le complexe de l'ARN polymérase II soit déjà présent sur le promoteur avant l'arrivée de c-Myc. En fait, l'activation du promoteur de *cad* semble corrélér avec la phosphorylation du domaine C-Terminal (CTD) de l'ARN polymérase II (EBERHARDY et FARNHAM, 2001). Ceci suggère donc que c-Myc serait impliqué dans l'initiation et l'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II. L'interaction entre c-Myc et la protéine P-TEFb serait responsable de ce mécanisme. Dans ce cas, Myc n'aurait pas d'effet sur le chargement de l'ARN polymérase II, ni sur la formation du complexe de pré-initiation. La formation du complexe de pré-initiation des gènes activés par Myc est régulée par différents facteurs. Par exemple, le réseau phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) régule la liaison de l'ARN polymérase II pour un groupe de gènes cibles de Myc qui sont impliqués dans la prolifération cellulaire (BOUCHARD *et al.*, 2004).

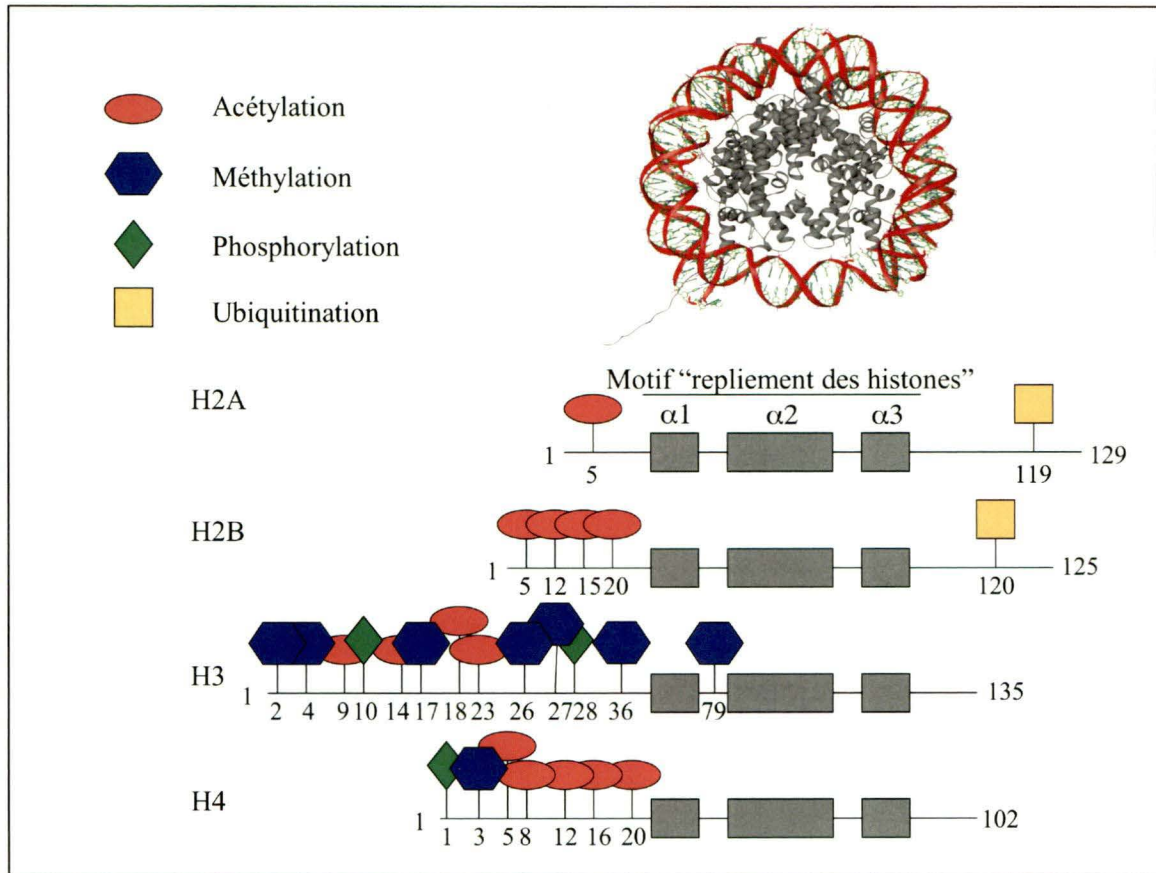


Figure 5 : Modifications possibles sur les histones composant le nucléosome. Les sites de modifications post-traductionnelles sont identifiés par une forme et un code de couleur et le chiffre correspond au numéro de l'acide aminé modifié dans chaque histone. Les boîtes grises représentent le motif de repliement qui est propre aux histones. Ce motif est aussi coloré en gris dans la représentation en ruban du nucléosome. Plusieurs de ces modifications sont associées à une chromatine active en transcription, exemple H3K4Me, H3K79Me, H3K9Ac, H3K14Ac, H3K18Ac, etc.

### 1.1.1.2 Mécanismes de répression

Les gènes qui sont réprimés par c-Myc ne semblent pas requérir la liaison de c-Myc à l'ADN du promoteur, mais plutôt le recrutement de co-répresseurs par des interactions protéines-protéines. c-Myc lui-même semble être recruté par ce type d'interactions avec d'autres facteurs de transcription tels TFII-I, NF-Y et Miz-1 (ROY *et al.*, 1993; IZUMI *et al.*, 2001; SCHNEIDER *et al.*, 1997). Un des modèles de répression par c-Myc est que celui-ci interfère avec le recrutement des co-activateurs pour ces facteurs de transcription. Un des systèmes le plus étudié pour l'interférence fonctionnelle par c-Myc est celui qui implique son interaction avec Miz-1. Dans ce système, Miz-1 agit normalement comme facteur de transcription activant les promoteurs de *p21<sup>Cip1</sup>* et *p15<sup>INK4b</sup>*. Il a été montré que Myc interfère avec le recrutement de p300 empêchant ainsi leur activation (STALLER *et al.*, 2001; SEOANE *et al.*, 2002) (figure 6). La diminution de la transcription de *c-myc* a pour effet d'activer les promoteurs de *p15<sup>INK4b</sup>*, *p21<sup>Cip1</sup>* et *p27<sup>Kip1</sup>*. Ceci résulte en un blocage du point de contrôle en fin de G1 empêchant ainsi l'initiation de la phase S du cycle cellulaire (figure 7). Ce mécanisme a été analysé en détail lors de la réponse au TGF- $\beta$  (figure 8). Lors de cette réponse, les niveaux de Myc diminuent dus à l'inhibition de la transcription par le complexe E2F4/5-p107-SMAD3/4 sur le promoteur de *c-myc* (SEOANE *et al.*, 2001). Dernièrement, un autre modèle a été avancé pour expliquer la répression par Myc sur le promoteur de *p21<sup>Cip1</sup>*. Brenner *et al.* ont trouvé que Myc pouvait interagir avec la protéine Dnmt3a, une méthyltransférase capable de méthyliser l'ADN aux îlots CpG. La méthylation des îlots CpG est associée à la répression de la transcription. Lorsque le complexe Myc-Dnmt3a est recruté par Miz-1, il semble que le

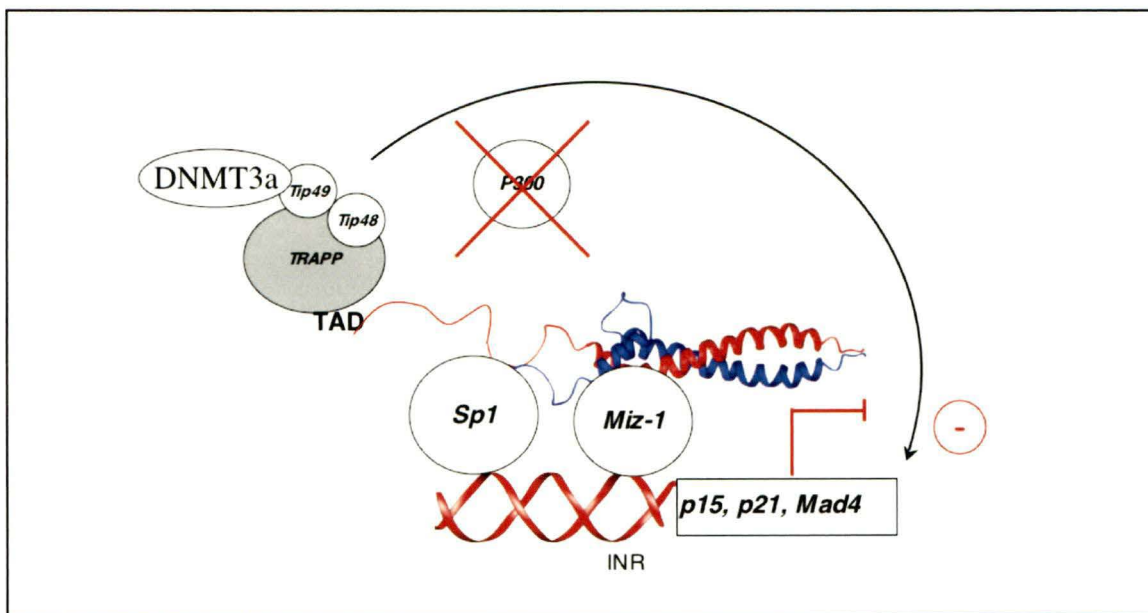


Figure 6 : Schéma représentant les deux modèles avancés par lesquels Myc pourrait inhiber la transcription des gènes cytostatiques. Le premier mécanisme avancé propose que l'interaction de l'hétérodimère c-Myc/Max avec Miz-1 empêcherait Miz-1 de recruter la protéine p300 nécessaire pour l'activation de la transcription par Miz-1. Le second modèle propose que l'inhibition pourrait aussi être due au recrutement de la protéine DNMT3a via le domaine de transactivation de Myc et la protéine TRAPP. DNMT3a possède une activité ADN méthyltransférase résultant d'une inhibition de la transcription. Ici, il est important de mentionner que les deux mécanismes ne sont pas exclusifs et que ceux-ci peuvent agir conjointement (STALLER *et al.*, 2001; SEOANE *et al.*, 2002; BRENNER *et al.*, 2005; PEUKERT *et al.*, 1997)

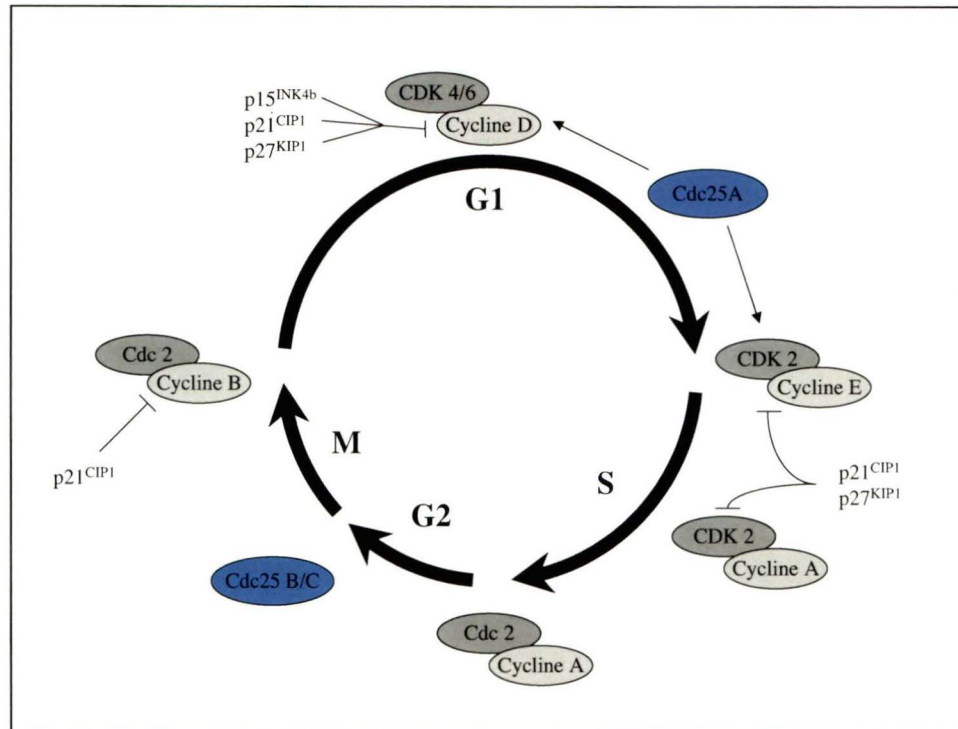


Figure 7 : Représentation du cycle cellulaire et de quelques points de contrôle. Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases majeures. Dans une cellule en croissance, les chromosomes sont répliqués pendant la phase de synthèse (S). Ensuite, la cellule croît dans la deuxième phase de croissance (G2) lui permettant d'atteindre une dimension pouvant permettre le début de la mitose (M) qui est divisée en plusieurs étapes. Finalement, après la mitose, la cellule-fille entre à nouveau dans une phase (G1) de croissance pour permettre la duplication du matériel génétique. Le passage à travers ce cycle cellulaire est régulé par plusieurs points de contrôle. Ces points de contrôle impliquent des complexes cyclines/cyclines kinases (Cycline/CDK) dépendantes qui elles-mêmes sont contrôlées par des inhibiteurs de CDK comme p21<sup>CIP1</sup> et p15<sup>INK4b</sup>.



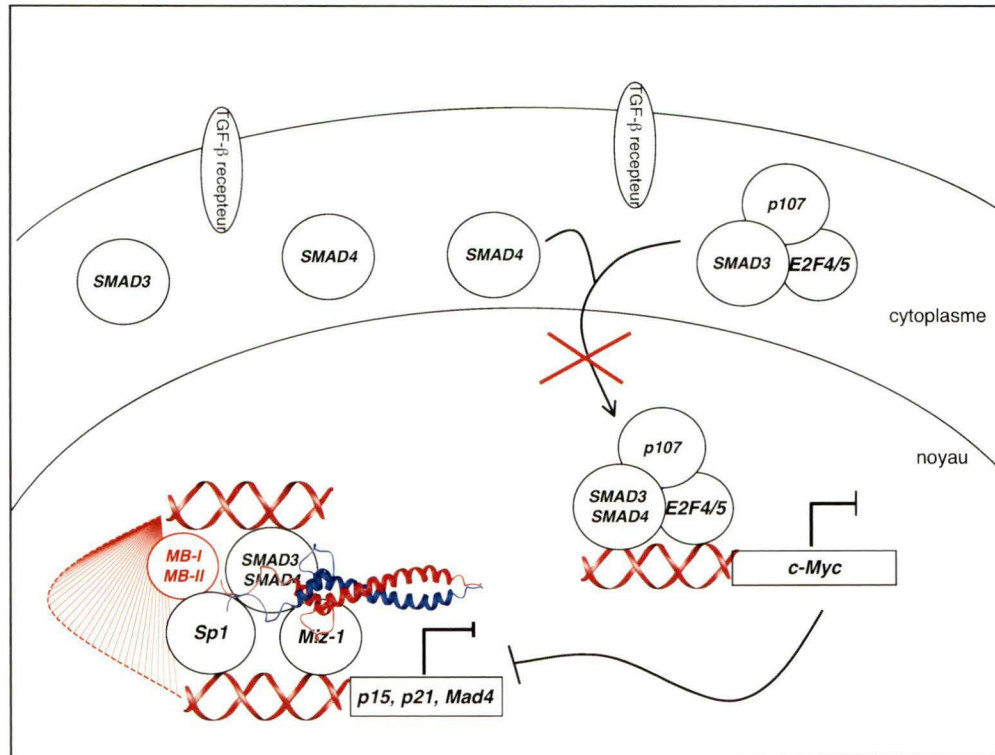


Figure 8 : Résistance au TGF- $\beta$  dans une cellule tumorale. Normalement, lors de la réponse au TGF- $\beta$ , il y a une dimérisation de Smad2/3 phosphorylée avec Smad4 puis, une translocation au noyau, où le complexe va s'associer à d'autres facteurs de transcription pour activer ou réprimer la transcription. Par contre, dans une cellule cancéreuse, il y a perte de contrôle de la transcription de c-Myc qui se retrouve donc surexprimé. Une des conséquences de cette surexpression est la formation d'un complexe avec l'hétérodimère c-Myc/Max et Miz-1. La formation de ce complexe réprime la transcription de gènes cytotatiques et empêche un arrêt du cycle cellulaire.

complexe méthyle et réprime la transcription sur ce promoteur (BRENNER *et al.*, 2005) (figure 6). Il est important de rappeler ici que c-Myc doit absolument hétérodimériser avec la protéine Max pour agir comme régulateur de la transcription et ce tant pour les mécanismes d'activation ou de répression. L'interaction avec Max semble essentielle pour le repliement adéquat de Myc (PEUKERT *et al.*, 1997).

### 1.1.2 Dérégulation de Myc dans les tumeurs

L'expression de c-Myc dans les cellules est normalement régulée de façon stricte par des signaux extérieurs provenant des facteurs de croissance et des contacts avec matrice extracellulaire. Lorsque les cellules ne sont pas en prolifération, elles expriment un très faible niveau de c-Myc. Par contre, en présence de facteurs de croissance et/ou en état de prolifération, l'expression de *c-myc* augmente rapidement. S'il y a une dérégulation de l'expression de *c-myc* pendant le cycle cellulaire, la cellule enclenche normalement l'apoptose via l'induction de p19/p14ARF et via p53 (ZINDY *et al.*, 1998). La perte de régulation du gène *c-myc* contribue au développement de cancer chez l'humain et peut se réaliser de plusieurs façons. Il peut résulter d'une translocation chromosomale, comme dans le cas du lymphome de Burkitt où le locus de *c-myc* est juxtaposé aux gènes d'immunoglobulines qui sont fortement transcrits dans les lymphocytes B (TAUB *et al.*, 1982). Il peut provenir d'une amplification du nombre de gènes de *c-myc* résultant d'une augmentation de son expression (ALITALO *et al.*, 1983) Il peut aussi avoir la perte du contrôle de la transcription de *c-myc* ce qui résulte d'une augmentation de sa

concentration cellulaire. Par exemple, dans les cancers du côlon et du foie, on retrouve une  $\beta$ -caténine mutante qui active de façon constitutive l'expression de *c-myc* (VAN DE WETERING *et al.*, 2002). D'autres mécanismes de surexpression sont aussi possibles incluant la délétion des séquences 3'UTR déstabilisant l'ARNm de *c-myc* résultant en l'élévation de la concentration d'ARNm (YEILDING *et al.*, 1996) et l'insertion adjacente de séquences rétrovirales régulatrices au locus de *c-myc* contrôlant l'expression de *c-myc* (LINIAL *et al.*, 1985). L'oncogène *ras* stabilise aussi c-Myc via une modification post-traductionnelle (SEARS *et al.*, 1999) qui implique la phosphorylation de Myc par l'activation des kinases ERK et l'inhibition de GSK-3 (figure 9). Le point commun de tous ces mécanismes stabilisant la protéine c-Myc est la perte des contrôles physiologiques qui régulent la transcription de Myc dans la majorité des tumeurs humaines (OSTER *et al.*, 2002). Par contre, la dérégulation de Myc n'est pas suffisante pour convertir les cellules humaines ou celles de rongeur en cellules cancéreuses. L'implication de d'autres oncogènes associés à la voie Ras est importante (LAND *et al.*, 1983; DRAYTON *et al.*, 2003). Ceci n'est pas sans rappeler la théorie des mutations additives. Selon cette théorie, une mutation dans une cellule peut donner un léger avantage à la croissance cellulaire. Si une des cellules-filles de celle-ci subit une seconde mutation, la croissance de cette cellule devient encore plus incontrôlée et il peut alors y avoir la formation d'une tumeur clonale bénigne. L'apparition de d'autres mutations pourrait mener au développement de tumeurs plus agressives et même au développement de métastases (LODISH *et al.*, 2000). Ras contrôle les fonctions des protéines dans le réseau de Myc de trois façons. Premièrement, Ras contrôle la stabilité de Myc en le phosphorylant sur deux résidus, la Thr58 et la Ser62 (SEARS *et al.*, 2000; YEH *et al.*,

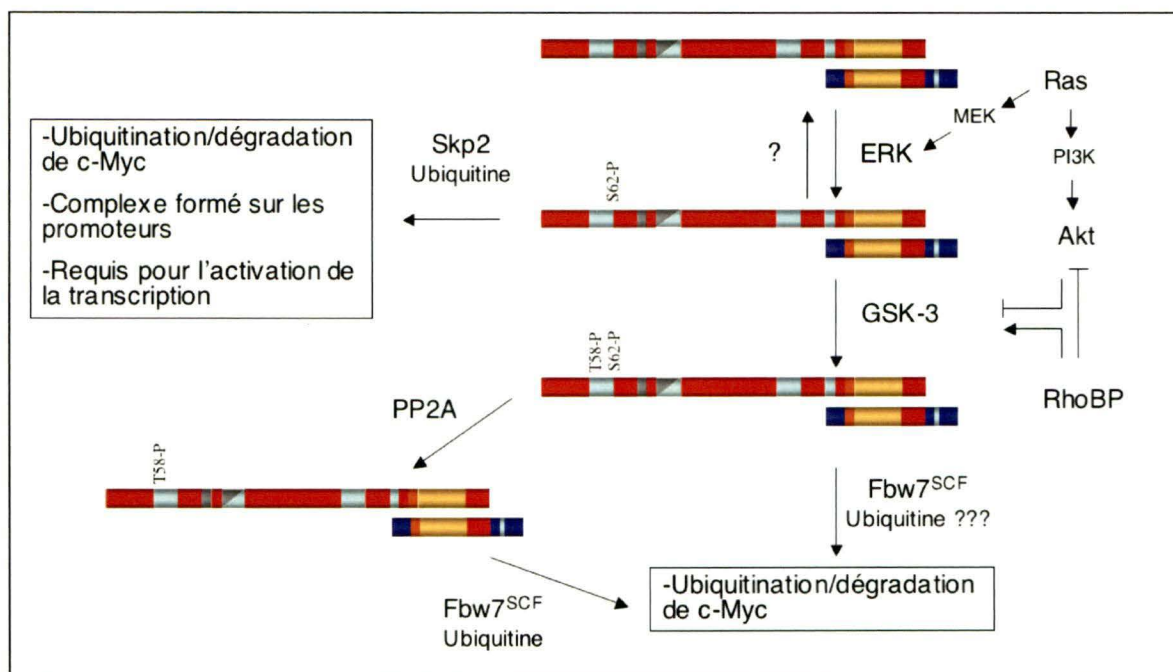


Figure 9 : Régulation de la stabilité de c-Myc par Ras. Ras contrôle la stabilité de Myc (en rouge) en le phosphorylant sur deux résidus, la Thr58 et la Ser62. La première phosphorylation sur la Ser62 par la kinase ERK stabilise Myc tandis que la phosphorylation de la Thr58 par la kinase GSK-3 favorise sa dégradation. La reconnaissance de la phosphorylation de la Ser62 par Skp2, une ubiquitine ligase, est une étape importante pour l'activation complète de la transcription par c-Myc. Le niveau de transcription des gènes cibles est grandement augmenté lors de cette ubiquitination. La protéine Max, partenaire essentiel de c-Myc, est identifiée en bleu

2004) (figure 9). La MAP kinase qui est activée par Ras via Raf, phosphoryle Myc sur la Ser62, ce qui mène à la stabilisation de Myc. À l'inverse, la phosphorylation de Myc à la Thr58 déstabilise Myc et facilite la déphosphorylation de la Ser62. La Thr58 est phosphorylée par GSK-3 (GREGORY *et al.*, 2003). La protéine SCF<sup>SBW7</sup> qui est une E3 ubiquitine ligase reconnaît quant à elle la Thr58 phosphorylée. SCF<sup>SBW7</sup> ubiquitine par la suite Myc, ce qui permet sa dégradation par le protéasome (WELCKER *et al.*, 2004; YADA *et al.*, 2004). Comme Ras inhibe la protéine GSK-3 par la voie PI3K, la résultante de l'activation de Ras est donc la stabilisation de Myc. De plus, des mutations ponctuelles de la Thr58 sont retrouvées dans plusieurs lymphomes empêchant ainsi la phosphorylation et la dégradation par SCF<sup>SBW7</sup> (BAHRAM *et al.*, 2000). Deuxièmement, plusieurs gènes qui sont régulés par Myc sont aussi régulés par les facteurs de transcription de la famille FOXO (BOUCHARD *et al.*, 2004) (figure 10). Troisièmement, la répression par Myc est régulée par la voie PI3K (figure 11). Effectivement, la phosphorylation de Myc par une kinase Rho-dépendante, qui se situe en aval de PI3K, a pour effet d'augmenter la répression de la thrombospondin-1. De plus, le domaine de liaison à l'ADN de Miz-1 est un substrat pour la phosphorylation par la kinase Akt. Après être phosphorylée, Miz-1 est reconnue par les protéines 14-3-3, l'empêchant de lier l'ADN et d'activer la transcription de p21<sup>CIP1</sup>. L'activation d'Akt compromet donc la capacité de Miz-1 à inhiber la prolifération cellulaire. (WANZEL *et al.*, 2005)

Les gènes régulés par Myc expliquent les différents phénotypes observés chez les cellules cancéreuses. Parmi ces gènes, plusieurs agissent en aval de Myc dans différentes voies biochimiques. Par exemple, l'inhibition de l'expression de p21<sup>CIP1</sup> par Myc explique

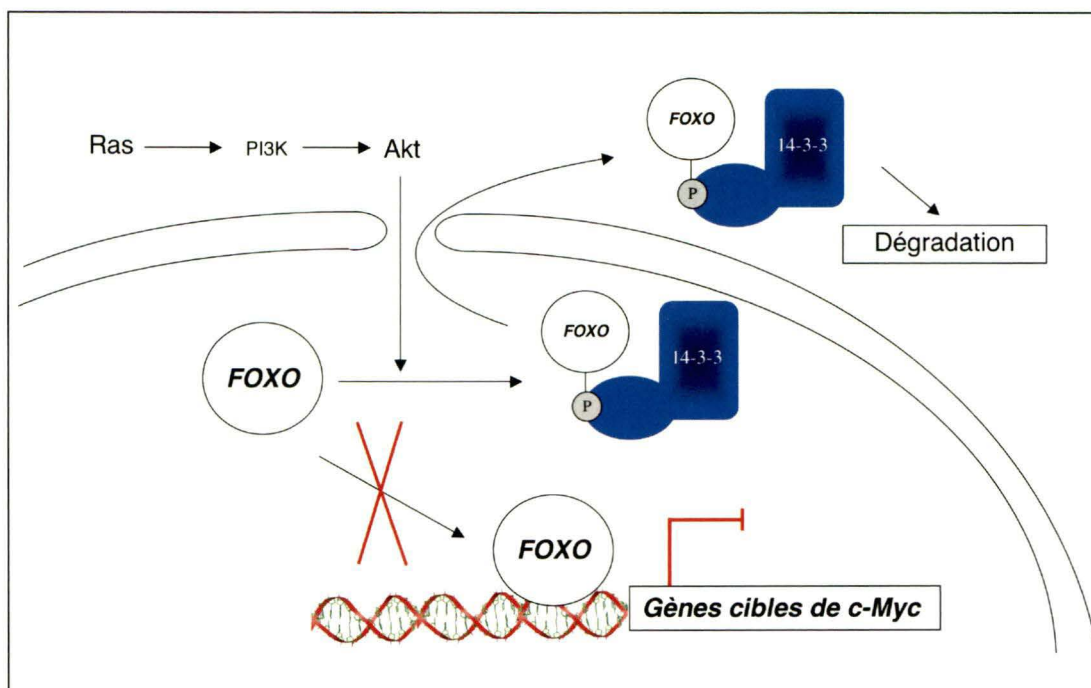


Figure 10 : Régulation des gènes cibles de c-Myc par les protéines FOXO. Les facteurs FOXO, lorsqu'ils sont non-phosphorylés, se lient sur les promoteurs des gènes cibles de Myc et inhibent leur transcription. Par contre, lorsqu'ils sont phosphorylés par la protéine kinase AKT, qui est un effecteur en aval de Ras, ils sont exportés hors du noyau où ils sont dégradés par le protéasome et ne peuvent plus réprimer la transcription (BOUCHARD *et al.*, 2004).

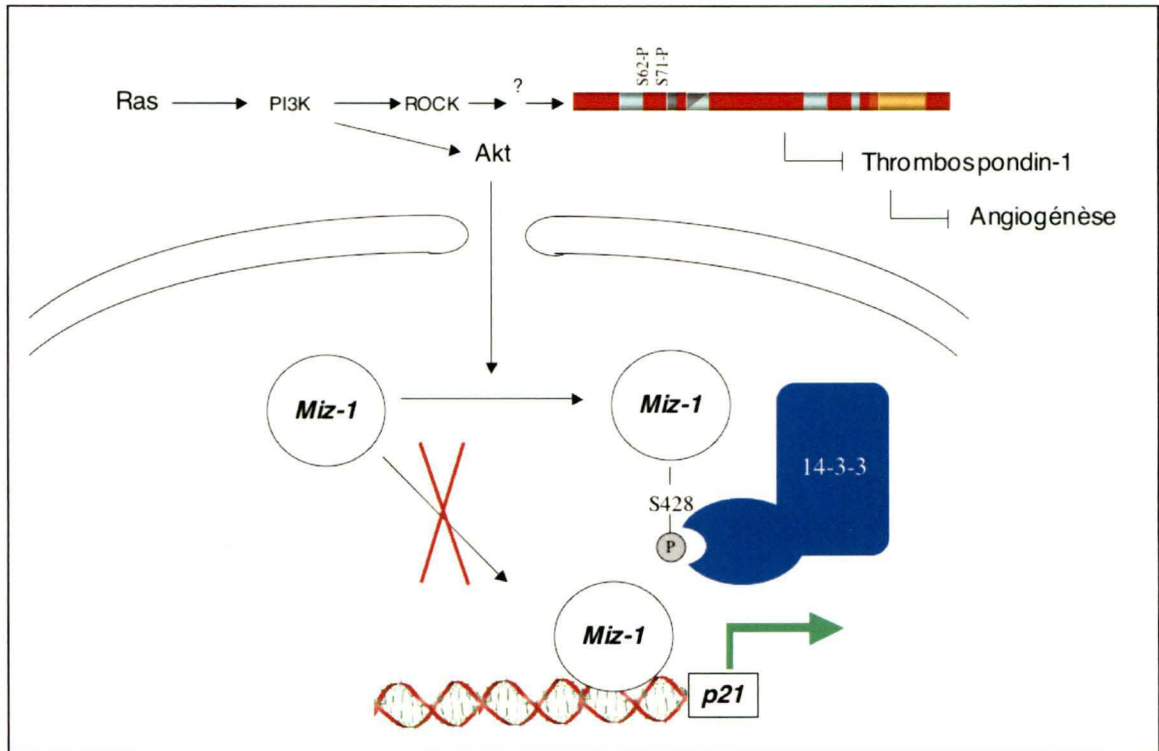


Figure 11 : Régulation de l'activité de Miz-1 par Ras. La kinase Akt phosphoryle la protéine Miz-1 l'empêchant de lier l'ADN dans les promoteurs de certains gènes cytotostatiques. Miz-1 est impliquée dans l'activation de la transcription de certains gènes cytotostatiques.

pourquoi les cellules transformées n'arrêtent plus dans la phase G1 du cycle cellulaire après avoir subi des dommages à l'ADN. p21<sup>CIP1</sup> est un inhibiteur de kinase cycline-dépendante (cdk) et est normalement surexprimé par la protéine p53 lorsque l'ADN a subi des dommages (EL-DEIRY *et al.*, 1994). De façon similaire, l'induction de l'expression du facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) explique la contribution de c-Myc dans l'angiogénèse (KNIES-BAMFORTH *et al.*, 2004).

Les voies cruciales menant à l'induction de la croissance cellulaire, la transformation cellulaire et la tumorigénèse ne sont pas très bien définies. Plusieurs études ont exposé que les tumeurs primaires humaines montrant une surexpression de c-Myc possédaient un patron d'expression de gènes distinct des tumeurs avec un niveau de c-Myc normal (BERWANGER *et al.*, 2002; LOSSOS *et al.*, 2002). Une évaluation systématique des gènes requis pour la croissance et la prolifération tumorale n'a pas encore été publiée, mais plusieurs résultats permettent de déduire les voies impliquées. Parmi celle-ci, notons la voie impliquant les complexes cycline-D-CDK4 (KOZAR *et al.*, 2004), l'activation des gènes accélérant la consommation de glucose et la glycolyse incluant la lactate déhydrogénase (SHIM *et al.*, 1997) et finalement l'implication de Myc comme régulateur important pour la biogénèse des ribosomes (ARABI *et al.*, 2005; GREWAL *et al.*, 2005).

## **1.2 Fonctions cellulaires des hétérodimères Mad/Max**



Les protéines de la famille Mad sont des antagonistes cellulaires des protéines de la famille Myc. Lorsque la cellule est en prolifération, il n'y a pas d'expression des protéines Mad. Par contre, le niveau d'expression de Mad I augmente et le niveau d'expression de Myc diminue lors de la différenciation cellulaire ce qui permet de faire la transition d'un hétérodimère Myc/Max à un hétérodimère Mad I/Max (CULTRARO *et al.*). Lors de la tumorigénèse, il y a perte de l'expression des protéines de la famille Mad et il y a fréquemment une surexpression des protéines de la famille Myc, ce qui provoque une prolifération cellulaire non contrôlée.

### 1.2.1 Mad I comme facteur de transcription

Mad I est une protéine qui a comme fonction l'inhibition de la transcription des gènes normalement activés par l'hétérodimère c-Myc/Max. Mad I doit elle aussi absolument hétérodimériser avec Max (AYER *et al.*, 1993). L'hétérodimère peut alors lier les sites E-Box et recruter des co-répresseurs, d'autres complexes protéiques qui auront comme principale fonction de déacétyler les histones (figure 12) (HEINZEL *et al.*, 1997). Tout comme c-Myc, la protéine Mad I contient un domaine qui est responsable du recrutement protéique. Il s'agit du domaine SID (« Sin3 Interacting Domain ») (BARRERA-HERNANDEZ *et al.*, 2000). Comme son nom l'indique, le domaine SID recrutera les protéines mSIN3 qui serviront de protéines d'échafaudage pour les autres complexes contenant les histones déacétylases (HDAC) (AYER *et al.*, 1995; HEINZEL *et al.*, 1997).

### 1.2.2 Dérégulation de Mad I dans les tumeurs

Les causes qui mènent à l'inhibition de l'expression de Mad I dans les cellules cancéreuses sont encore ambiguës. L'expression des protéines Mad I, Mad 2 et Mad 4 est augmentée lors de la réponse au TGF- $\beta$  dans une cellule saine (SIEGEL *et al.*, 2003). Le complexe Miz-1-Smad2/3-Smad4 a été proposé comme étant responsable de cette augmentation. De plus, dans ce cas, il y a diminution de l'expression de c-Myc par le complexe Smad2/3-E2F-p107 (figure 13) ce qui permet le passage d'un hétérodimère c-Myc/Max à un hétérodimère Mad I/Max. Ceci provoque un arrêt de la transcription des gènes de croissance et de prolifération, et permet l'activation de la transcription des inhibiteurs de cyclines p15<sup>INK4b</sup>, p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup>. Dans le cas d'une cellule cancéreuse, il y a souvent la perte de réponse au TGF- $\beta$  (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000).

Cette résistance au TGF- $\beta$  est due principalement à l'inhibition de la transcription des inhibiteurs de cyclines p15<sup>INK4b</sup>, p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup>, mais aussi probablement à l'inhibition de l'expression des protéines Mad, en particulier Mad 4, par c-Myc (FENG *et al.*, 2002; STALLER *et al.*, 2001; SEOANE *et al.*, 2001; KIME et WRIGHT, 2003) (figure 8). Le mécanisme de cette répression a été décrit en détail précédemment et implique la protéine Miz-1. Donc, lors de la tumorigénèse, nous observons une surexpression de c-Myc, une perte de l'expression de Mad 4 tout comme la perte d'expression de p15<sup>INK4b</sup>, p21<sup>CIP</sup> ou p27<sup>KIP</sup>, résultant en une prolifération cellulaire. Aucune étude n'a encore déterminé si la régulation de la répression de l'expression des autres membres de la famille Mad passait par le même mécanisme.

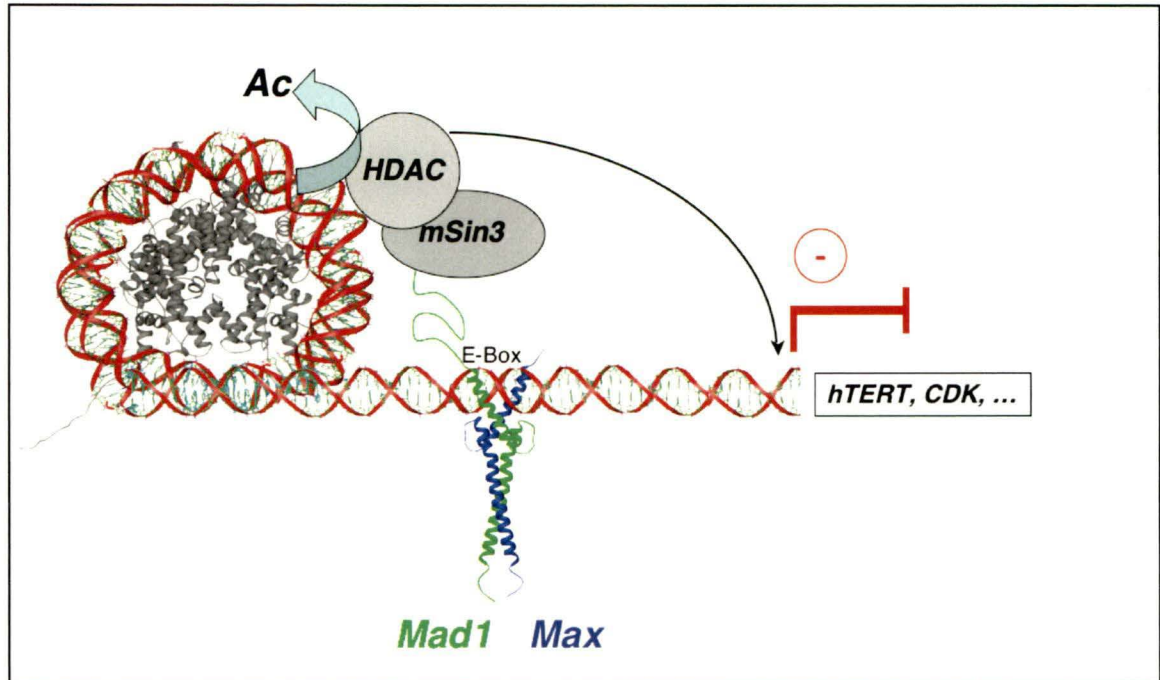


Figure 12 : Schéma résumant l'inhibition de la transcription par l'hétérodimère Mad I/Max. L'hétérodimère lie une séquence d'ADN nommée E-Box (CACGTG) située à l'intérieur des promoteurs des gènes cibles et recrute des co-répresseurs protéiques. Parmi les fonctions de ces co-répresseurs, ceux-ci possèdent une activité histone déacétylase qui mène à l'inhibition de la transcription des gènes.

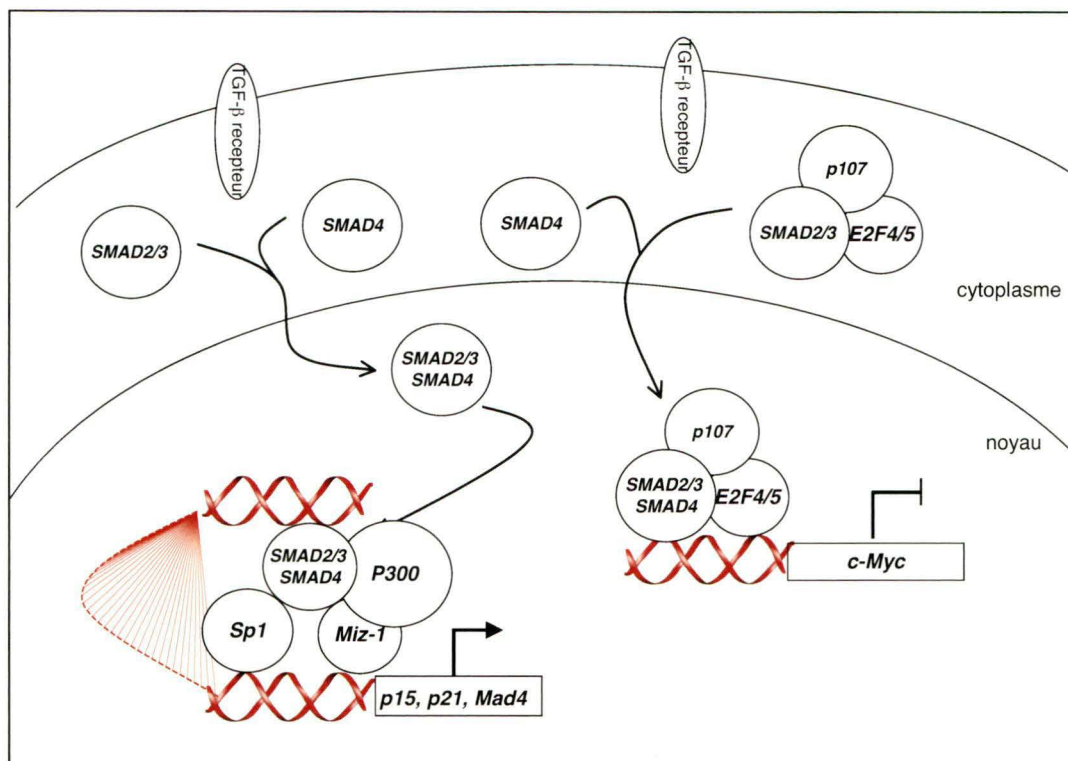


Figure 13 : Réponse au TGF- $\beta$ . Le complexe de signalisation lors de la réponse au TGF- $\beta$  passe par l'hétérodimérisation des récepteurs au TGF- $\beta$  de type I et II. Ces récepteurs sont des récepteurs Ser/Thr kinase qui lorsqu'ils sont activés vont phosphoryler Smad2 ou Smad3. Il va alors avoir une dimérisation avec Smad2/3 phosphorylée et Smad4 puis une translocation au noyau, où le complexe va s'associer à d'autres facteurs de transcription pour activer ou réprimer la transcription (voir texte pour détails). Par exemple, l'expression de p15INK<sup>4b</sup> cause l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (voir figure 7).

### 1.3 Fonctions cellulaires de l'homodimère Max

#### 1.3.1 Caractérisation de la protéine Max

Max existe principalement sous deux formes, p21 Max et p22 Max, les deux protéines étant produites par épissage alternatif de l'ARN pré-messager (DUNN *et al.*, 1994). De plus, un troisième isoforme où la région basique est absente nommé dMax a été observé et est lui aussi produit par épissage alternatif (ARSURA *et al.*, 1995). Les protéines Max diffèrent seulement par l'insertion de 9 acides aminés dans leur partie N-Terminale. Lorsque deux monomères de Max s'associent pour former un homodimère, celui-ci peut lier une séquence d'ADN (CACGTG), nommée E-Box. Par contre, comme Max peut aussi hétérodimériser avec Myc et Mad, l'homodimérisation de celui-ci doit être réversible. La séquence E-Box a la particularité de se retrouver dans plusieurs promoteurs de gènes liés à la prolifération cellulaire et dont l'expression est modulée par le réseau c-Myc/Max/Mad. La liaison à l'ADN par Max est modulée par la phosphorylation de deux sérines présentes dans la partie N-Terminale de la protéine, à l'extérieur du domaine basique. Lorsque ces deux résidus sont phosphorylés *in vitro* par la caséine kinase II, l'homodimère Max ne lie plus l'ADN (BOUSSET *et al.*, 1994; GRANDORI *et al.*, 2000). Chez les mammifères, toutes les protéines qui peuvent lier une séquence d'ADN E-Box font partie de la même famille, celle des b-HLH. La famille des protéines

possédant un b-HLH-LZ se trouve donc être un sous-groupe de la grande famille des b-HLH. Bien qu'aucun rôle précis n'ait encore été établi pour l'homodimère de Max *in vivo*, différentes observations suggèrent que ce dernier pourrait avoir des fonctions additionnelles à celle d'être le partenaire essentiel des familles de protéines Myc ou Mad. Parmi ces observations, mentionnons l'inhibition de la transcription de gènes cibles de c-Myc lors de la surexpression de Max (GU *et al.*, 1993), l'augmentation de son expression lors de la réponse au TGF- $\beta$  (SIEGEL *et al.*, 2003) et l'augmentation de son expression lors de la migration des cellules intestinales selon l'axe crypto-villus (MARIADASON *et al.*, 2005).

### 1.3.2 Caractéristiques structurales du b-HLH de Max

Au plan structural, le domaine basique est une région très conservée de Max avec 60% des résidus qui sont identiques aux domaines basiques des autres protéines du réseau Myc/Max/Mad. Cette région est responsable de la liaison à l'ADN (BLACKWOOD *et al.*, 1991). Lorsqu'on observe la structure d'un b-HLH-LZ de Max en absence d'ADN (1R05.pdb; <http://www.rcsb.org/>), les 14 premiers acides aminés du domaine basique sont très mobiles (SAUVÉ *et al.*, 2004) (figure 14). Par contre, cette région possède une structure hélicale résiduelle. Les derniers acides aminés du domaine basique, les résidus 15-18, sont les premiers à posséder une structure en hélice  $\alpha$ . Cet état conformationnel temporaire et réversible, dans lequel le domaine basique est structuré en absence d'ADN, a été avancé comme étant important pour la liaison spécifique au site E-Box (figure 14)

(SAUVÉ *et al.*, 2004). La structure du domaine basique lié à l'ADN montre clairement que ce domaine se replie en hélice  $\alpha$  et se lie à l'intérieur des deux sillons majeurs de la séquence E-Box (figure 1) (FERRE D'AMARE *et al.*, 1993). À la suite du domaine basique, on retrouve le motif HLH. Ce motif est caractérisé par l'entassement de 4 hélices  $\alpha$  qui forment un noyau hydrophobe très important pour la dimérisation (NAIR et BURLEY, 2006). Bien que ce motif se replie de façon similaire en présence et en absence d'ADN, celui-ci possède plus de mouvement et est moins stable en absence d'ADN tel que déterminé par les mesures de relaxation lors de la détermination de la structure en solution en absence d'ADN (SAUVÉ *et al.*, 2004). Aucun déterminant de reconnaissance moléculaire spécifique n'a encore été proposé ou montré à l'intérieur du HLH. Contrairement aux protéines de la famille des b-HLH, le sous-groupe des protéines possédant un b-HLH-LZ se distinguent par la présence d'un domaine leucine zipper en C-Terminal du b-HLH.

### 1.3.3 Caractéristiques structurales du domaine leucine zipper

Le domaine leucine zipper est un domaine de dimérisation commun chez plusieurs protéines. Il est caractérisé par une super hélice de pas gauche formée par deux hélices  $\alpha$  de pas droit (WALSHAW et WOOLFSON, 2003; CHAREST et LAVIGNE, 2006). Chaque hélice  $\alpha$ , dans une super hélice, possède une séquence répétée de sept acides aminés identifiés par les lettres *abcdefg*. Cette séquence répétée de sept acides aminés est

très caractéristique et porte le nom d'heptade. La projection des hélices  $\alpha$ , sous forme de roue hélicale, permet de bien visualiser cette heptade (figure 15). Les positions *a* et *d* sont



Figure 14: Structure du b-HLH-LZ de Max en solution déterminée par RMN (1R05.pdb).

L'acide aminé en 15<sup>e</sup> position est identifié afin de visualiser le début de la structure en hélice  $\alpha$ .



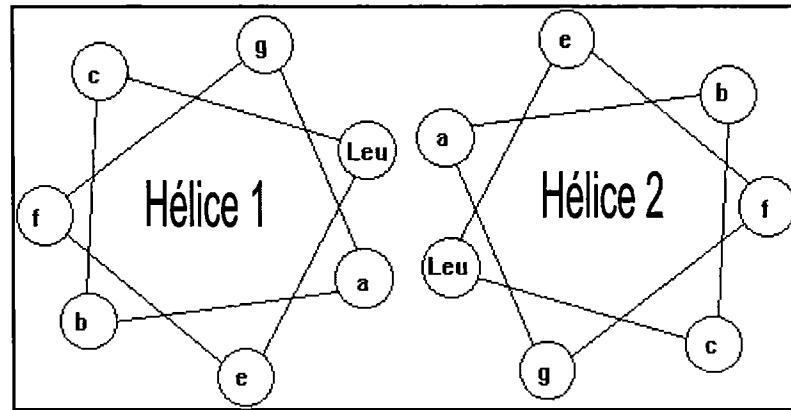


Figure 15 : Représentation sous forme de roues hélicales des deux hélices  $\alpha$  formant le domaine leucine zipper. Les hélices  $\alpha$  sont caractérisées par une séquence répétée de sept acides aminés (heptade) où les positions **a** et **d** sont occupées par des résidus hydrophobes. Le domaine leucine zipper tire son nom de la présence d'un résidu leucine en position **d** sur au moins 5 heptades.

normalement occupées par des résidus hydrophobes et forment l'interface de dimérisation. Le domaine leucine zipper est caractérisé par la présence d'une leucine à la position *d*. La position *a* est occupée normalement par un résidu hydrophobe dont la chaîne latérale est substituée en position  $\beta$  (i.e. un résidu valine ou isoleucine). (WAGSCHAL *et al.*, 1999; ZHU *et al.*, 1993; TRIPET *et al.*, 2000; HARBURY *et al.*, 1993; HARBURY *et al.*, 1994; WOOLFSON et ALBER, 1995; CHAREST et LAVIGNE; 2006). La position *a* peut aussi être occupée par des résidus glutamate, aspartate ou asparagine. Cette dispersion en position *a* joue principalement un rôle dans la modulation de la stabilité et la reconnaissance moléculaire (CHARREST et LAVIGNE, 2006). Les positions *e* et *g* sont souvent occupées par des résidus chargés (Glu, Asp, Lys ou Arg). De plus, lorsque les résidus en position *e* d'une hélice (*i*) et les résidus en position *g* de l'heptade précédente sur l'autre hélice (*i-5*) sont occupés par des acides aminés aux charges opposées, il y a la formation d'un pont salin inter hélice (LAVIGNE *et al.*, 1996; CHAO *et al.*, 1996; CHAO *et al.*, 1998). Dans le cas des protéines possédant seulement un domaine basique et un domaine leucine zipper (b-ZIP), la formation des ponts salins est responsable de la reconnaissance moléculaire spécifique (GLOVER ET HARRISON, 1995) Pour les domaines b-HLH-LZ, la formation de ces ponts salins augmente la stabilité du dimère initialement formé par l'enfouissement des chaînes latérales des acides aminés hydrophobes en position *a* et *d*.

## **1.4 Déterminants structuraux responsables de la reconnaissance moléculaire et de la stabilité des différents hétérodimères.**

### **1.4.1 Déterminants structuraux du domaine LZ de Max régissant la réversibilité de l'homodimérisation de Max et de l'hétérodimérisation avec les familles Myc et Mad.**

La séquence du domaine LZ de Max nous permet d'observer que les positions **a** et **d** sont occupées par des acides aminés hydrophobes à l'exception de 3 positions. En effet, on remarque la présence de 2 asparagines en position **a** et d'une histidine en position **d** (figure 16-17). La présence d'asparagines est aussi conservée dans d'autres domaines LZ, comme celui de GCN4, et il a été proposé que celles-ci faisaient des ponts hydrogènes (ponts H) à l'interface de dimérisation (CHAREST et LAVIGNE, 2006). De plus, la stabilisation amenée par la formation des ponts H était moins grande que la stabilisation apportée par des résidus hydrophobes (ex. valine), mais n'empêchait pas la formation de la super hélice. C'est cette diminution de la stabilité qui permet la réversibilité de la dimérisation. Un des rôles proposés pour les asparagines est aussi d'orienter la dimérisation et de prévenir la formation d'oligomères (trimères, tétramères) (HARBURY *et al.*, 1993; JUNIUS *et al.*; 1995). Outre les asparagines en position **a**, le leucine zipper de Max possède aussi une histidine en position **d** (FERRE D'AMARE *et al.*, 1993; BROWNLIE *et al.*, 1997). Cet acide aminé est rarement retrouvé à cette position et a été proposé comme étant en grande partie responsable de la réversibilité de l'homodimère de Max (LAVIGNE *et al.*, 1998). Cette réversibilité est essentielle pour que Max puisse se

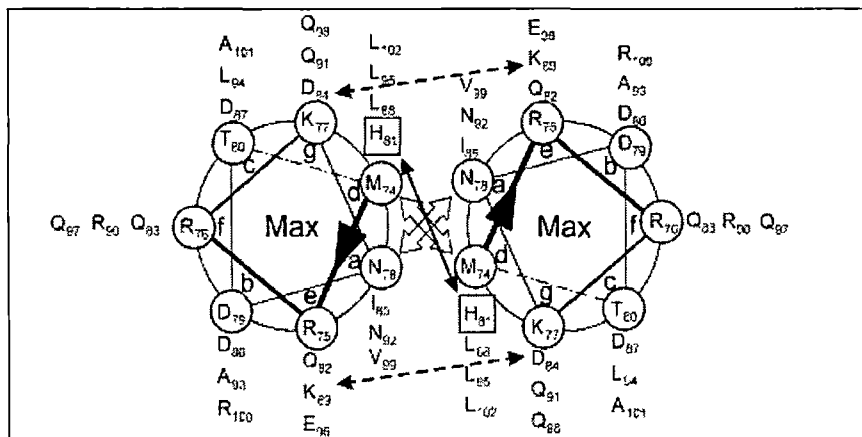


Figure 16 : Représentation sous forme de roues hélicales des deux hélices  $\alpha$  formant le domaine leucine zipper de l'homodimère Max. Les flèches avec un trait pointillé indiquent les interactions favorables et les flèches avec un trait plein, les interactions défavorables.

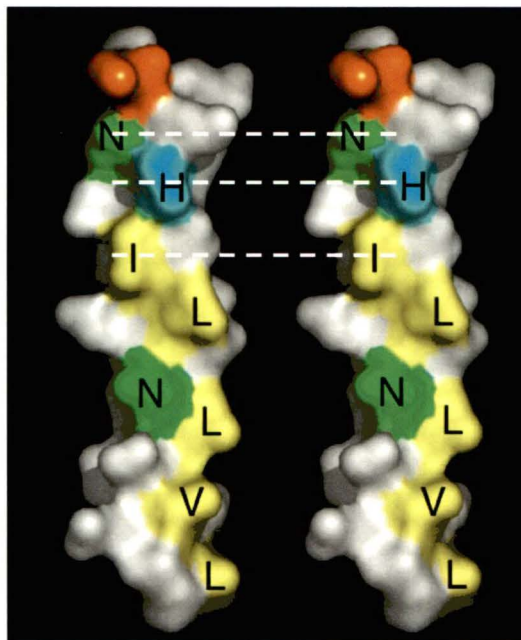


Figure 17 : Représentation de la surface moléculaire des deux hélices  $\alpha$  formant le domaine leucine zipper de l'homodimère de Max. L'interface de dimérisation a été colorée. Les résidus hydrophobes sont colorés en jaune, les résidus méthionines en orange, les résidus polaires en vert et finalement l'histidine qui déstabilise Max en bleue claire, indiquant qu'à pH neutre, l'histidine est parfois chargée, parfois non-chargée. Les lignes blanches représentent la dimérisation selon le modèle bosse dans les trous (« Knobs into holes ») avancé par Crick en 1953 (CHAREST et LAVIGNE, 2006).

dissocier sous forme monomérique et ainsi hétérodimériser avec ces différents partenaires. Ce résidu serait aussi crucial pour l'hétérodimérisation avec les protéines de la famille Myc et de la famille Mad (MUHLE-GOLL *et al.*, 1995; LAVIGNE *et al.*, 1995)

#### 1.4.2 Déterminants structuraux des domaines LZ de l'hétérodimère c-Myc/Max

Lorsque l'on observe l'alignement de séquences des protéines qui dimérisent avec Max (figure 18), on remarque que tous les membres possèdent un résidu glutamate à la position 5a. Ce résidu a été montré comme étant responsable de l'hétérodimérisation spécifique avec Max et de la déstabilisation de l'homodimère Mad (LAVIGNE *et al.*, 1998; MONTAGNE *et al.*, 2005). La protéine c-Myc possède en plus un autre résidu glutamate en position 12a, lui aussi impliqué dans la stabilisation de l'hétérodimère c-Myc/Max est proposé pour déstabiliser l'homodimère de c-Myc (MUHLE-GOLL *et al.*, 1995, LAVIGNE *et al.*, 1995; LAVIGNE *et al.*, 1998). La déstabilisation de l'homodimère de c-Myc s'explique par la présence de ces deux résidus glutamates, situés à l'interface de dimérisation des domaines LZ. La présence de résidus chargés à l'interface a été montrée comme étant grandement défavorable puisque ceux-ci doivent s'enfouir à l'intérieur d'un environnement hydrophobe (MONTAGNE *et al.*, 2005). Pour pouvoir enfouir ces deux charges négatives dans l'interface hydrophobe, celles-ci se doivent absolument d'être solvatées. C'est exactement le rôle que joue l'histidine en position d de Max. Celui-ci permet la solvation des charges portées par les glutamates

	<i>defgab</i>	<i>cdefgab</i>	<i>cde fgab</i>	<i>cdefgabcde</i>	<i>fgabcdefg</i>	<i>abcde</i>
c-Myc	VQAE <b>E</b> Q	KLISEEDLLR	KRREQLKHK	LEQLR		
Mad 1	LEDC <b>D</b> R	KAVHQIDQLQ	REQRHLKRQ	LEKLG		
Mxi 1	LEEAE <b>R</b>	KSQHOLENLE	REQRFLKWR	LEQLQ		
Mad 4	LEEQ <b>D</b> R	RALSIKEQLQ	QEHRFLKRR	LEQLS		
N-Myc	LQAE <b>E</b> H	QLLLEKEKLQ	ARQQQLLKK	IEHAR		
L-Myc	LVGA <b>E</b> K	RMATEKRQLR	CRQQQLQKR	IAYLS		

Figure 18 : Alignement de séquence en acides aminés des différentes protéines hétérodimérisant avec Max. Il est important de noter la présence d'un résidu chargé à la première position *a*. Ce résidu a été montré comme étant crucial dans la prévention de la formation de l'homodimère de la protéine Mad et il a été proposé que celui-ci devait prévenir aussi la formation de l'homodimère Myc/Myc (MONTAGNE *et al.*, 2005).

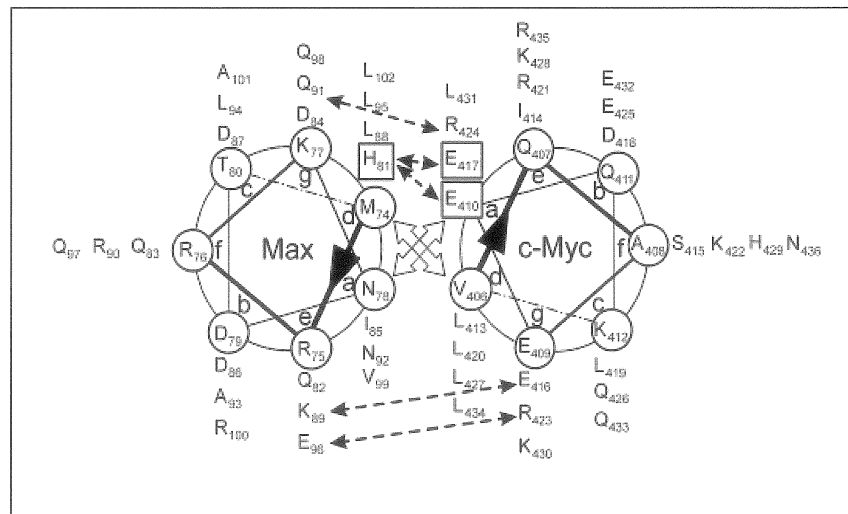


Figure 19 : Représentation sous forme de roues hélicales des deux hélices  $\alpha$  formant le domaine leucine zipper de l'hétérodimère c-Myc/Max. Les flèches avec un trait pointillé indiquent les interactions favorables et les flèches avec un trait plein, les interactions défavorables.



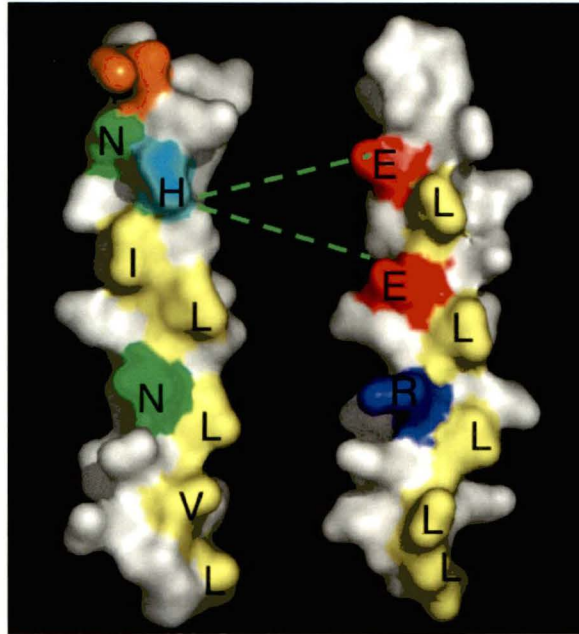


Figure 20 : Représentation de la surface moléculaire des deux hélices  $\alpha$  formant le domaine leucine zipper de l'hétérodimère c-Myc/Max. L'interface de dimérisation a été colorée. Les résidus hydrophobes sont colorés en jaune, le résidu méthionine en orange, les résidus polaires en vert, les résidus basiques en bleu foncé, les résidus acides en rouge et finalement l'histidine qui déstabilise Max en bleu clair indiquant qu'à pH neutre, l'histidine est parfois chargée, parfois non-chargée.

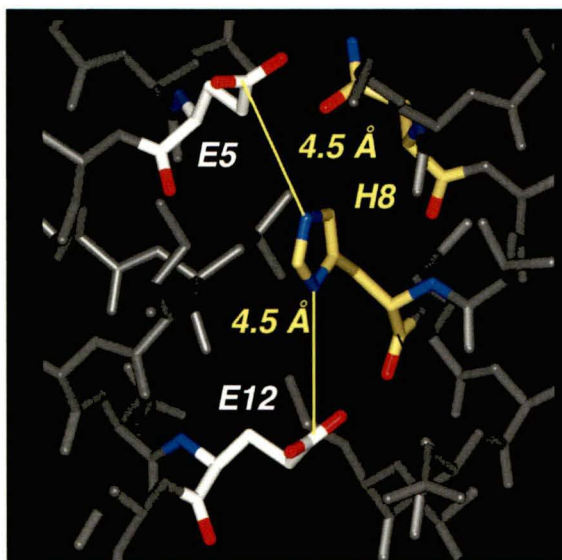


Figure 21 : Représentation du pont salin tel que caractérisé lors de la détermination de la structure en solution du leucine de l'hétérodimère c-Myc/Max (LAVIGNE *et al.*, 1998)

par la formation d'un pont salin à l'interface de dimérisation (figure 19-21). De plus, un autre pont salin inter hélice formé par des résidus en position **e** et **g** permettent de stabiliser davantage l'hétérodimère (LAVIGNE *et al.*, 1998).

### 1.4.3 Déterminants structuraux des domaines LZ de l'hétérodimère Mad I/Max

Remarquablement, toutes les protéines de la famille Mad, tout comme les protéines de la famille Myc, possèdent un résidu acide conservé en position **a** (figure 18) dans le domaine LZ. Le mécanisme de dimérisation des domaines LZ de cette famille a donc été proposé comme étant le même que celui de la famille Myc, c'est-à-dire par la formation d'un pont salin entre l'histidine en position **d** de Max et le résidu acide en position **a** de Mad (MONTAGNE *et al.*, 2003). La formation de ce pont peut être observé dans la structure cristalline des b-HLH-LZ de l'hétérodimère Mad I/Max (NAIR *et BURLEY*, 2003). La déstabilisation du b-HLH-LZ de Mad I due à la présence d'un aspartate à l'interface de dimérisation a ensuite été étudiée. Il a été montré que cet aspartate était suffisante pour empêcher l'homodimérisation du b-HLH-LZ de Mad I. En effet, la mutation de ce résidu en asparagine, c'est-à-dire le remplacement d'un groupement  $-OH$  par un groupement  $-NH_2$ , permet l'homodimérisation du b-HLH-LZ de Mad I (MONTAGNE *et al.*, 2005). L'effet de cette mutation sur la reconnaissance moléculaire entre le b-HLH-LZ de Mad I et Max est en cours de caractérisation.

## 1.5 Objectifs du projet de recherche

L'hypothèse directrice de cette thèse est que l'homodimère de Max a une activité antagoniste de l'hétérodimère c-Myc/Max *in vivo*. Comme nous l'avons exposé à la section précédente, plusieurs évidences retrouvées dans la littérature sont compatibles avec cette proposition. Le mécanisme par lequel l'homodimère Max pourrait antagoniser l'activité transcriptionnelle de c-Myc serait par compétition pour les séquences E-Box retrouvées dans les promoteurs des gènes cibles (point 3 de la figure 22). Ce mécanisme sera vérifié au chapitre trois. Cette activité de l'homodimère Max présuppose que ce dernier peut homodimériser *in vivo* à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Or, ni la structure du produit de gène complet, ni sa constante de dissociation ne sont connues. Ainsi, le chapitre deux sera consacré à la caractérisation structurale de p21 Max et à la détermination de sa constante de dissociation ( $K_D$ ). Comme il le sera montré, le  $K_D$  de p21 Max est effectivement de l'ordre du micromolaire. Ce résultat indique que p21 Max pourrait effectivement homodimériser *in vivo*. Cependant, un mutant de Max avec un  $K_D$  plus faible (homodimère plus stable) pourrait avoir une meilleure efficacité pour antagoniser l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère c-Myc/Max. Le premier chapitre décrira le design et la production d'un mutant du b-HLH-LZ dont la stabilité thermodynamique a été augmentée.

De façon plus spécifique, les objectifs de la thèse peuvent être rassemblés en trois grands objectifs (figure 22). Le premier consiste à caractériser les résidus du domaine b-HLH-

LZ qui déstabilisent l'homodimère de Max. Cette caractérisation permettra de vérifier si un homodimère de Max plus stable peut inhiber de façon plus efficace la transcription de gènes cibles de c-Myc, comme observé par GU *et al.* (1993). Pour réaliser cet objectif, deux mutations seront effectuées dans le leucine zipper à l'intérieur du domaine b-HLH-LZ. Les acides aminés ciblés sont l'asparagine et l'histidine en position 78 et 81, respectivement. Les objectifs de ces deux mutations sont d'augmenter le corps hydrophobe du leucine zipper de Max, d'éliminer une charge positive située à l'interface de dimérisation déstabilisant par le fait même le leucine zipper de Max et d'enlever l'histidine impliquée dans un pont salin à l'interface de dimérisation et dans la stabilisation de l'hétérodimère c-Myc/Max. Ce sont ces acides aminés qui ont été avancés comme étant responsables de la réversibilité de la dimérisation du domaine b-HLH-LZ de Max. Par la suite, les analyses structurales et les dénaturations thermiques suivies par spectroscopie de dichroïsme circulaire permettront d'obtenir des valeurs nous indiquant la stabilité de l'homodimère de type sauvage et mutant en absence et en présence d'ADN contenant son site de liaison E-Box.

La simulation des dénaturations sera effectuée grâce au modèle mathématique développé par M. Frédéric Gagnon. Ce modèle permet de déterminer les différentes constantes de dissociation. Comme second objectif, nous avons voulu déterminer la stabilité et la structure d'un des deux isoformes de la protéine Max, soit l'isoforme de 21 kDa nommé p21 Max. Cette caractérisation structurale est très importante puisque aucune donnée structurale n'est disponible sur cette protéine en solution. De plus, nous effectuerons la même double mutation que celle effectuée dans le LZ du domaine b-HLH-LZ et nous

analyserons la structure secondaire et la stabilité des deux homodimères par dichroïsme circulaire et par simulation des courbes de dénaturation obtenues. Finalement, comme c-Myc doit hétérodimériser avec Max pour activer la transcription de hTERT, le troisième objectif de ce projet de recherche sera de vérifier si l'expression de Max *in vivo* peut mener à la répression de la transcription du promoteur de hTERT dans des cellules surexprimant c-Myc. De plus, l'expression *in vivo* du double mutant sera effectuée pour comparer la répression de la transcription à celle obtenue avec le Max de type sauvage. Si tel est le cas, Max pourrait non seulement être une protéine accessoire, mais aussi posséder un rôle cellulaire distinct.

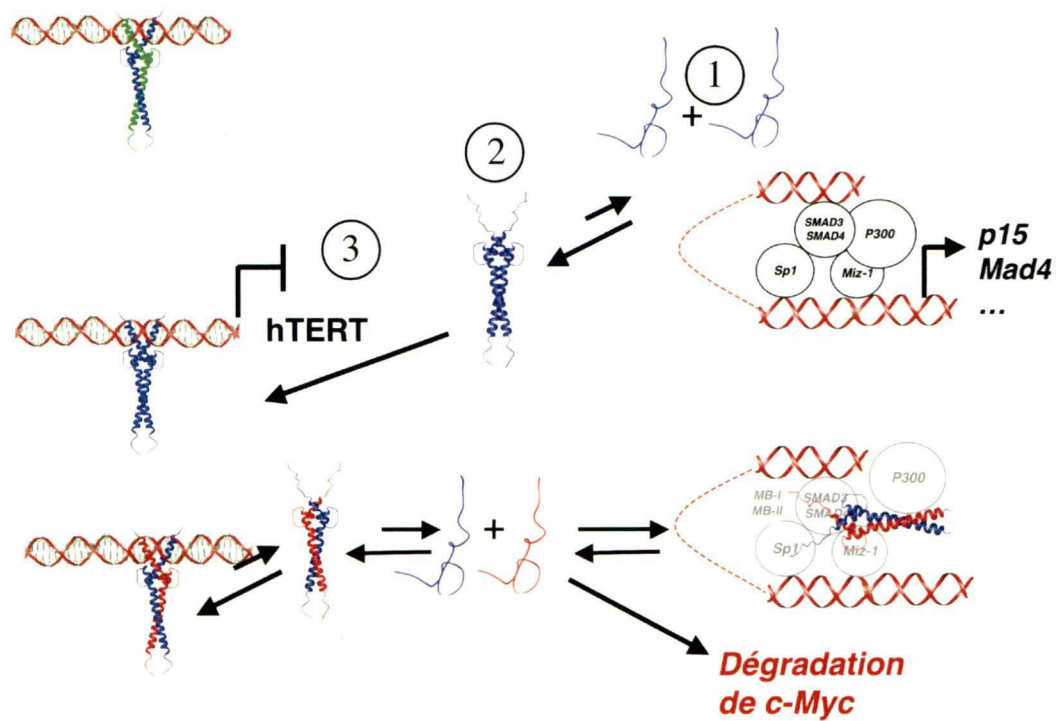


Figure 22 : Principaux objectifs du projet de recherche. 1- Caractérisation structurale et thermodynamique du domaine b-HLH-LZ et d'un mutant où les résidus responsables de la réversibilité de l'homodimérisation du b-HLH-LZ de Max auront été mutés. 2- Caractérisation structurale et thermodynamique d'un des isoformes de Max. 3- Caractérisation de l'effet de l'expression de Max et du double mutant sur le promoteur d'un des gènes activés par c-Myc, hTERT. La protéine Max est représentée en bleu, c-Myc en rouge et Mad 1 en vert.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1 Clonage et mutagenèse

#### 2.1.1 Clonage du b-HLH-LZ de Max dans le vecteur d'expression procaryote pET3a.

Pour obtenir le b-HLH-LZ de Max, nommé par la suite Max\*, une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été effectuée dans un tampon 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) et 2,5 unités de PureTaq ADN polymérase (PureTaq Ready-to-Go PCR beads, Amersham). Pour réaliser cette réaction, 50 à 100 ng du vecteur pVZ1 Max (fourni par R.N. Eisenman, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA) a été utilisé comme matrice d'ADN et 2,5 pmol des oligonucléotides 5'-d (CCGCC ATATGGCTGACAAACGGGCTCAT) -3' et 5'-d (GGCGGGATCCCTCCAGTGCAC GGACTTG) -3' comme amorces. Le programme utilisé comportait les étapes suivantes : une dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 minutes suivie de 30 cycles d'amplification constitués de 1 minute à 95°C, 1 minute à 55°C et de 1 minutes à 72°C. Les amorces utilisées contiennent respectivement un site de restriction pour les enzymes de restriction *Nde* I et *Bam* HI. Les produits de PCR obtenus et le vecteur d'expression pET 3a ont ensuite été digérés avec ces enzymes de restriction dans un tampon contenant 10 mM



Tris-HCl (pH 7,9), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT et 100 µg/mL de BSA et les digestions ont été purifiées par gel d'agarose 1.5 % à l'aide d'une colonne QUIAquick (QUIAquick gel extraction Kit, Qiagen). Par la suite, 500 ng produits de PCR purifiés ont été ligués à 100 ng de vecteur purifié à l'aide de la T4 DNA ligase dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl (pH7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM DTT, 1mM ATP et 25 µg/mL BSA. Finalement, le produit de ligation a été transformé dans des bactéries DH5α.

### 2.1.2 Mutagenèse dirigée pour obtenir la double mutation N69V-H72L dans le LZ de Max\*.

Pour produire la double mutation N69V-H72L dans le domaine LZ du b-HLH-LZ de Max\* (Max\*VL), par mutagenèse dirigée, trois réaction de PCR ont été effectuées avec 50 à 100 ng du vecteur pET3a contenant Max\* dans tampon utilisé lors de l'amplification de Max\* (PureTaq Ready-to-Go PCR beads, Amersham). La première réaction a été réalisée avec 2,5 pmol des oligonucléotides 5'-d (CCGCCATATGGCTGA CAAACGGGCTCAT) -3' et 5'-d (CTTGCTGGAGTGTGTGGACTTTCC) -3' comme amorces. La deuxième amorce contient des substitutions de nucléotides permettant l'introduction d'une valine en position 69 et d'une leucine en position 72. Cette première réaction a ensuite été purifiée par gel d'agarose 1.5 % à l'aide d'une colonne QUIAquick (QUIAquick gel extraction Kit, Qiagen). Cette réaction a permis de générer le premier des deux fragments nécessaires à la mutagenèse. Le deuxième fragment a été obtenu avec une réaction de PCR utilisant 2,5 pmol des oligonucléotides 5'-

d (GGAAAGTCCACACACTCCAGCAAG) -3' et 5'-d (GGCGGGATCCCTCCAGTGC ACGGACTTG) -3' comme amorces. La première amorce contient cette fois-ci les substitutions de nucléotides permettant l'introduction d'une valine en position 69 et d'une leucine en position 72. Ce deuxième fragment a ensuite été purifié par gel d'agarose 1.5 % à l'aide d'une colonne QIAquick (QIAquick gel extraction Kit, Qiagen). Pour générer le b-HLH-LZ de Max contenant la double mutation, la troisième réaction de PCR a été accomplie en utilisant les produits purifiés de la première et de la deuxième réaction de PCR comme matrice d'ADN et en utilisant les oligonucléotides utilisés préalablement lors du clonage de Max\*. Le programme utilisé lors des trois réactions de PCR est le même que celui qui a été utilisé pour générer Max\*. Les digestions ont été effectuées avec les mêmes enzymes de restriction et dans les mêmes conditions que lors du clonage de Max\*. La ligation a aussi été effectuée selon la même procédure et dans le même plasmide que lors du clonage de Max\*. Finalement, le produit de ligation est transformé dans des bactéries DH5 $\alpha$ .

### 2.1.3 Addition des acides aminés GSGC en C-terminal du b-HLH-LZ de Max\* et Max\*VL.

Le vecteur pET3a permet l'ajout d'une séquence d'ADN codant pour les acides aminés GSGC en 3' de la séquence d'ADN cloné. Cette séquence a été ajoutée en omettant de codon d'arrêt à la fin du dernier codon du LZ de Max\* et Max\*VL. L'ajout de ces 4 acides aminés a permis de créer un homodimère dont chacun des monomères a été

associé par l'oxydation des cystéines en C-terminal. Ceci a permis ultérieurement d'effectuer une étude thermodynamique d'un système non dissociatif.

#### 2.1.4 Mutagenèse dirigée pour obtenir la mutation C87G située en C-terminal de Max\* et Max\*VL dans le vecteur pET3a.

Puisque l'homodimère de Max peut se dissocier *in vivo*, la cystéine permettant l'association des monomères, lors de leur oxydation, a été mutée en glycine pour permettre à l'homodimère de se dissocier en monomère. La mutagenèse dirigée a été effectuée avec l'aide de la trousse QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) selon les instructions du manufacturier et avec l'oligonucléotide 5'-d (GGATCCGGCGGCTAACAAAGCCCGAAAG) -3'. Le principe de cette technique est d'hybrider le plasmide d'intérêt, pET3a, avec notre oligonucléotide contenant la mutation désirée, C87G. Par la suite, le plasmide est amplifié par PCR avec la *Pfu* Turbo. L'ADN ayant servi de matrice est méthylé contrairement à l'ADN nouvellement synthétisé est dégradé par digestion enzymatique avec *Dpn* I. L'ADN nouvellement synthétisé par PCR est ensuite transformé dans les bactéries XL1-Blue.

### 2.1.5 Clonage de p21 Max dans le vecteur pET3a.

Pour obtenir le produit de gène complet de Max, nommé par la suite p21 Max, une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été effectuée dans le tampon utilisé lors de l'amplification de Max\* (PureTaq Ready-to-Go PCR beads, Amersham). Pour réaliser cette réaction, 50 à 100 ng du vecteur pVZ1 Max (fourni par R.N. Eisenman, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA) a été utilisé comme matrice d'ADN et 2,5 pmol des oligonucléotides 5'-d (CCGCCATATGAGC GATAACGATGACATC) -3' et 5'-d (TCTGGGATCCTTAGCTGGCCTCCATCCG GA) -3' comme amorces. Le programme utilisé lors des trois réactions de PCR est le même que celui qui a été utilisé pour générer Max\*. Les digestions ont été effectuées avec les mêmes enzymes de restriction et dans les conditions utilisées lors du clonage de Max\*. La ligation a aussi été effectuée selon la même procédure et dans le même plasmide que lors du clonage de Max\*. Finalement, le produit de ligation a été transformé dans des bactéries DH5 $\alpha$ .

### 2.1.6 Mutagenèse dirigée pour obtenir la double mutation N69V-H72L dans le LZ de p21 Max.

Pour produire la double mutation N69V-H72L dans produit de gène complet de Max (p21 Max VL), par mutagenèse dirigée, trois réaction de PCR ont été effectuées avec 50 à 100 ng du vecteur pET3a contenant p21 Max dans le tampon utilisé lors de

l'amplification de Max\* (PureTaq Ready-to-Go PCR beads, Amersham). La première réaction a été réalisée avec 2,5 pmol des oligonucléotides 5'-d (CCGCCATATGAGCGATAACGATGACATC) -3' et 5'-d (CTTGCTGGAGTGTGTGGACTTTCC) -3' comme amorces. La deuxième amorce contient des substitutions de nucléotides permettant l'introduction d'une valine en position 69 et d'une leucine en position 72. Cette première réaction a ensuite été purifiée par gel d'agarose 1.5 % à l'aide d'une colonne QUIAquick (QUIAquick gel extraction Kit, Quiagen). Cette réaction a permis de générer le premier des deux fragments nécessaires à la mutagenèse. Le deuxième fragment a quant à lui été obtenu avec une réaction de PCR utilisant 2,5 pmol des oligonucléotides 5'-d (GGAAAGTCCACACACTCCAGCAAG) -3' et 5'-d (TCTGGGATCCTTAGCTGGCCTCCATCCGGA) -3' comme amorces. La première amorce contient cette fois-ci les substitutions de nucléotides permettant l'introduction d'une valine en position 69 et d'une leucine en position 72. Ce deuxième fragment a ensuite été purifié par gel d'agarose 1.5 % à l'aide d'une colonne QUIAquick (QUIAquick gel extraction Kit, Quiagen). Pour générer le b-HLH-LZ de Max contenant la double mutation, la troisième réaction de PCR a été accomplie en utilisant les produits purifiés de la première et de la deuxième réaction de PCR comme matrice d'ADN et en utilisant les oligonucléotides utilisés préalablement lors du clonage de p21 Max. Le programme utilisé lors des trois réactions de PCR est le même que celui qui a été utilisé pour générer Max\*. Les digestions ont été effectuées avec les mêmes enzymes de restriction et dans les conditions utilisées lors du clonage de Max\*. La ligation a aussi été effectuée selon la même procédure et dans le même plasmide que lors du clonage de Max\*. Finalement, le produit de ligation a été transformé dans des bactéries DH5 $\alpha$ .

### 2.1.7 Clonage de HA Max dans pCDNA3.1

Le clonage de HA Max a été fait en amplifiant le gène de Max à l'aide d'une réaction de PCR (PureTaq Ready-to-Go PCR beads, Amersham). Pour réaliser cette réaction, 50 à 100 ng du vecteur pVZ1 Max (fourni par R.N. Eisenman, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA) a été utilisé comme matrice d'ADN et 2,5 pmol des oligonucléotides 5'- (TCGGATCCATGAGCGATAACGATGACATC) -3' et 5'- (GCAGAATTCTTAGCTGGCCTCCATCCGGA) -3'. Le programme utilisé lors des trois réactions de PCR est le même que celui qui a été utilisé pour générer Max\*. Les amorces utilisées contiennent respectivement un site de restriction pour les enzymes de restriction *Bam* HI et *Eco* RI. Les produits de PCR obtenus et le vecteur d'expression pCDNA3.1 contenant la Tag HA (fourni par le Dr Luc Desgroseillers) ont ensuite été digérés avec ces enzymes de restriction dans un tampon contenant 10 mM Tris-HCl (pH 7,9), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT et 100 µg/mL de BSA. Les digestions ont été purifiées par gel d'agarose 1.5 % à l'aide d'une colonne QUIAquick (QUIAquick gel extraction Kit, Quiagen). Par la suite, 500 ng de produits de PCR purifiés ont été ligués à 100 ng de vecteur purifié à l'aide de la T4 DNA ligase dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl (pH7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM DTT, 1mM ATP et 25 µg/mL BSA. Finalement, le produit de ligation a été transformé dans des bactéries DH5α.

### 2.1.8 Clonage de HA Max VL dans pCDNA3.1

Pour produire la double mutation N69V-H72L dans HA Max (HA Max VL), par mutagenèse dirigée, trois réaction de PCR ont été effectuées avec 50 à 100 ng du vecteur pCDNA3.1 contenant HA Max dans le tampon utilisé lors de l'amplification de Max\* (PureTaq Ready-to-Go PCR beads, Amersham). La première réaction a été réalisée avec 2,5 pmol des oligonucléotides 5'-d (TCGGATCCATGAGCGATAACGATGACATC) - 3' et 5'-d (CTTGCTGGAGTGTGTGGACTTTCC) -3' comme amorces. La deuxième amorce contient des substitutions de nucléotides permettant l'introduction d'une valine en position 69 et d'une leucine en position 72. Cette première réaction a ensuite été purifiée par gel d'agarose 1.5 % à l'aide d'une colonne QUIAquick (QUIAquick gel extraction Kit, Quiagen). Cette réaction a permis de générer le premier des deux fragments nécessaires à la mutagenèse. Le deuxième fragment a quant à lui été obtenu avec une réaction de PCR utilisant 2,5 pmol des oligonucléotides 5'-d (GGAAAG TCCACACACTCCAGCAAG) -3' et 5'-d (GCAGAATTCTTAGCTGGCCTCCATCCG GA) -3' comme amorces. La première amorce contient cette fois-ci les substitutions de nucléotides permettant l'introduction d'une valine en position 69 et d'une leucine en position 72. Ce deuxième fragment a ensuite été purifié par gel d'agarose 1.5 % à l'aide d'une colonne QUIAquick (QUIAquick gel extraction Kit, Quiagen). Pour générer HA Max contenant la double mutation, la troisième réaction de PCR a été accomplie en utilisant les produits purifiés de la première et de la deuxième réaction de PCR comme matrice d'ADN et en utilisant les oligonucléotides utilisés préalablement lors du clonage de HA Max. Le programme utilisé lors des trois réactions de PCR est le même que celui

qui a été utilisé pour générer Max\*. Les digestions ont été effectuées avec les mêmes enzymes de restriction et dans les conditions utilisées lors du clonage de HA Max. La ligation a aussi été effectuée selon la même procédure et dans le même plasmide que lors du clonage de HA Max. Finalement, le produit de ligation a été transformé dans des bactéries DH5 $\alpha$ .

#### 2.1.9 Isolation de l'ADN plasmidique par miniprep.

Les colonies obtenues sont prélevées à l'aide du manche de Koch et sont utilisées pour inoculer 5 mL de milieu LB (1% tryptone, 0.5% extrait de levure, 171 mM NaCl, pH 7.0) contenant les antibiotiques nécessaires pour chaque souche bactérienne (ampicilline : DH5 $\alpha$ , XL1-Blue; ampicilline, chloramphénicol : BL21 DE3 pLysS). L'inoculum est incubé à 37°C avec une agitation de 225 rpm pendant 16-20 heures. L'ADN plasmidique est isolé par lyse alcaline. Un volume de 1.5 mL de culture bactérienne est centrifugé à 13 000 rpm pendant 2 minutes. Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu dans 100  $\mu$ L de solution I (50 mM glucose, 24 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA et 10 U RNase A). Par la suite, 200  $\mu$ L de solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) sont ajoutés suivi de 200  $\mu$ L de chloroforme. Le mélange est incubé à la température de la pièce pendant 1 minute. 150  $\mu$ L de solution III (3 M acétate de potassium, 5% HCOOH) sont ajoutés et la solution est bien mélangée en inversant les tubes 4-5 fois. La séparation des phases est effectuée par centrifugation à 13 000 rpm à la température de la pièce pendant 2 minutes. La phase aqueuse est récoltée et l'ADN est précipité en ajoutant 2 volumes d'éthanol 100% suivi



d'une centrifugation à 13 000 rpm à 4°C pendant 2 minutes. Le culot est lavé une fois avec 1 mL d'éthanol 70 % et est centrifugé à nouveau 13 000 rpm à 4°C pendant 2 minutes. Le culot est séché et resuspendu dans 25-50 µL d'eau stérile.

## **2.2 Expression et purification**

### 2.2.1 Transformation plasmidiques des bactéries DH5α, XL1-Blue et BL21 DE3 pLysS.

10 µL de la réaction de ligation sont ajoutés à 50 µL de bactéries compétentes et le mélange est incubé sur glace pendant 15 à 20 minutes. Par la suite, les bactéries compétentes sont soumises à un choc thermique par incubation à 42°C pendant 1 minutes. Elles sont de nouveau incubées sur glace deux minutes. Un volume de 340 µL de Luria Browth (LB) est ensuite ajouté et le mélange est incubé à 37°C pendant 30 minutes. Les bactéries sont étalées sur un pétri LB-agar contenant 50 µg/mL d'ampicilline (DH5α, XL1-Blue) ou 50 µg/mL d'ampicilline et chloramphénicol (BL21 DE3 pLysS) et incubées pendant un minimum de 16 heures à 37°C.

### 2.2.2 MaxiPrep par gradient de chlorure de césium

Après la transformation dans les bactéries DH5 $\alpha$ , une pré-culture de 2 mL de LB avec ampicilline est inoculée avec une colonie prélevée du pétri. La pré-culture est incubée à 37°C pendant 5 heures avec agitation. La pré-culture est transférée dans un erlenmeyer de 1L contenant 250 mL de TB (1.2% tryptone, 2.4% extrait de levure, 0.004% glycérol, 0.231% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.254% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ainsi que l'ampicilline. La culture est ensuite incubée pour un minimum de 16 heures à 37°C avec agitation. La culture est centrifugée à 3500g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans 7 mL de solution I contenant 20  $\mu$ g/mL de RNase A. Ensuite, 16 mL de solution II sont ajoutés et la solution est incubée à la température de la pièce pendant 10 minutes. Après l'incubation, 12 mL de solution III sont ajoutés et la solution est alors incubée sur glace pendant 1 heure. La solution est centrifugée à 5000g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube. Au surnageant, un volume d'isopropanol est ajouté, suivi d'une incubation à -20°C pendant 10 minutes. La solution est à nouveau centrifugée à 3500g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est lavé avec 5 mL d'éthanol 100% puis séché pendant 10 à 15 minutes. Il est alors resuspendu dans 4.2 mL de TE (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA). Par la suite, 4.2 g de CsCl et 150  $\mu$ L de bromure d'éthidium (10 ng/mL) sont ajoutés. L'échantillon est transféré dans un tube pour ultracentrifugation et centrifugé à 50 000g pendant 16 heures à 20°C. La bande correspondant à l'ADN plasmidique est recueillie. Le bromure d'éthidium est retiré par plusieurs lavages successifs au butanol saturé en CsCl. L'ADN est dialysé dans l'eau durant toute une nuit à 4°C. L'ADN est

finalement transféré dans un tube eppendorf et sa concentration est mesurée par spectrophotométrie à 260 et 280 nm.

### 2.2.3 Expression des protéines recombinantes (Max\*, Max\*VL, p21 Max, p21 Max VL).

Après la transformation des vecteurs pET3a contenant leurs inserts respectifs (Max\*, Max\*VL, p21 Max ou p21 Max VL) dans les bactéries BL21 pLysS, une colonie est prélevée pour inoculer 2 mL de LB avec ampicilline (1 mg/mL) et chloramphénicol (100 µg/mL). La pré-culture est incubée durant toute une nuit à 37°C. Cette pré-culture est ensuite utilisée pour inoculer 1L de LB contenant de l'ampicilline (1 mg/mL) et du chloramphénicol (100 µg/mL). Cette culture est ensuite incubée à 30°C (Max\* et Max\*VL) ou à 37°C (p21 Max et p21 Max VL) jusqu'à ce que la D.O.<sub>600nm</sub> atteigne 0,6. L'expression des protéines est induite par l'ajout d'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) (0.6 mM). L'induction est maintenue pendant 3-4 heures. Par la suite, les bactéries sont centrifugées à 3500g à pendant 20 minutes à 4°C. Les culots sont ensuite congelés et conservés à -20°C avant purification.

#### 2.2.4 Purification de Max\* et Max\*VL

Le culot provenant de l'induction est dégelé sur glace et est resuspendu dans 3 mL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 0.1 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % NP-40). Les bactéries sont ensuite lysées par sonication (3 x 2 minutes). La solution est ensuite traitée avec la DNase I pancréatique bovine (0.1 mg/ml) pendant 30-60 minutes à 37°C avec agitation. L'ADN et les protéines acides sont précipitées par l'ajout de PEI (0.25%). La solution est incubée sur glace pendant 5 minutes puis centrifugée à 30 000g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite dilué dans 15 mL de tampon A (50 mM acétate de sodium, pH 5.0) puis injecté sur une colonne HiTrap SP sepharose HP (Amersham) préalablement équilibrée. La colonne est ensuite lavée avec 10% de tampon B (tampon A + 5M NaCl). Les protéines sont éluées avec un gradient de sel (10% à 35% de tampon B). Les différentes fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE et les fractions contenant la protéine pure sont combinées, puis le sel et le tampon acétate sont retirés à l'aide d'une colonne HiTrap desalting (Amersham). Les fractions contenant la protéine sont alors combinées. La protéine est lyophilisée et resuspendue dans un tampon désiré pour l'analyse.

### 2.2.5 Purification de p21 Max et p21 Max VL

Le culot provenant de l'induction est dégelé sur glace et est resuspendu dans 10 mL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 0.1 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % NP-40). Les bactéries sont ensuite lysées par sonication (5 x 2 minutes). L'homogénat est centrifugé à 20 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite traité avec la DNase I pancréatique bovine (0.1 mg/ml) pendant 90 minutes à 37°C avec agitation. L'ADN et les protéines acides sont ensuite précipitées par l'ajout de PEI (0.25%). La solution est incubée sur glace pendant 5 minutes puis centrifugée à 30 000g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite dilué dans 15 mL de tampon A (50 mM acétate de sodium, pH 5.0) puis injecté sur une colonne HiTrap SP sepharose HP (Amersham) préalablement équilibrée avec le tampon A. La colonne est ensuite lavée avec un tampon B contenant 50 mM phosphate (pH 2.8) + 2M urée. Les protéines sont éluées avec un gradient de sel (0% à 100% de tampon B contenant 3M NaCl). Les différentes fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE et les fractions contenant la protéine pure sont combinées, puis le sel et le tampon acétate sont retirés à l'aide d'une colonne HiTrap desalting (Amersham). Les fractions contenant la protéine sont alors combinées. La protéine est lyophilisée puis resuspendue dans un tampon désiré pour l'analyse.

## 2.3 Vérification des clones et des protéines obtenues

Après l'extraction de l'ADN plasmidique par miniprep, la présence de l'insert désiré est vérifiée par digestion avec les enzymes de restrictions utilisées pour le clonage. Pour Max\*, Max\*VL, p21 Max et p21 Max VL, la vérification de la présence de l'insert est effectué par digestions avec les enzymes de restriction *Nde* I et *Bam* HI. Pour vérifier les inserts, HA Max et HA Max VL, présents dans le vecteur pCDNA3.1, une digestion avec les enzymes de restrictions *Bam* HI et *Eco* RI est effectuée. Toutes les digestions sont ensuite analysées sur un gel d'agarose 1.5 % contenant 0.1 mg/ml de bromure d'éthidium.

### 2.3.1 Séquençage des clones obtenus

Après la vérification de la présence d'un insert sur gel d'agarose, les clones sont envoyés au service de séquençage de l'Université de Calgary. C'est à la suite de la confirmation de la séquence que les plasmides sont produits en grande quantité (Maxiprep) et purifiés par gradient de chlorure de césium. C'est seulement après la confirmation de la séquence que les bactéries BL21 DE3 pLysS sont transformées avec les plasmides pET3a ou que les cellules HCT-116 ou HT-1080 sont transfectées avec les plasmides pcDNA3, pGL2, EGFP, Red ou MycEGFP.

### 2.3.2 Spectrométrie de masse

Après l'expression et la purification des protéines Max\*, Max\*VL, p21 Max et p21 Max VL, celles-ci ont été analysées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF, ESI). C'est seulement lorsque celles-ci ont été confirmées quant à leur masse et à leur composition que l'analyse des protéines est effectuée.

## **2.4 Analyse structurale et thermodynamique des protéines obtenues**

L'analyse structurale et thermodynamique présentée dans la thèse a été effectuée à l'aide de deux techniques de spectroscopie. La première technique est la spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire (CD) et la seconde est la résonance magnétique nucléaire (RMN) multidimensionnelle. Le CD permet l'étude et la quantification globale de la structure secondaire (hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ , etc.) de polypeptides et de protéines en solution. Les changements de structure dus à différentes conditions comme le pH, les agents dénaturants et la température peuvent donc facilement être suivis. Cette spectroscopie est bien adaptée pour nos études où seulement deux type de structures secondaires sont présentes (hélice  $\alpha$  et structure aléatoire).

Cette technique spectroscopique repose sur la capacité qu'ont les structures secondaires

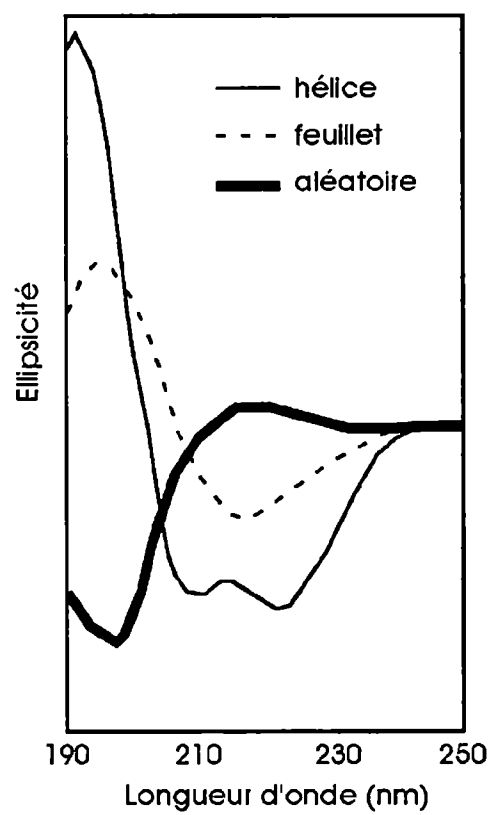


Figure 23 : Spectres de dichroïsme circulaire de différentes structures secondaires pures.



des protéines d'être optiquement actives dues à leur asymétrie intrinsèque qui absorbe de façon inégale la lumière polarisée circulairement à droite et la lumière polarisée circulairement à gauche. Sans entrer dans les détails théoriques (voir KELLY *et al.* en 2005 pour une revue), le dichroïsme est la différence entre le coefficient d'extinction molaire de la lumière polarisée vers la droite et le coefficient d'extinction molaire de la lumière polarisée vers la gauche (Er-El). Techniquement cette différence se mesure sur le spectropolarimètre par une mesure en millidegré qui est la différence entre le plan de polarisation de la lumière incidente et celui de la lumière transmise suite à l'absorption de la lumière par l'échantillon. Le dichroïsme circulaire dépend de l'absorbance de la lumière par les liaisons amides du squelette polypeptidique et dépend donc de la longueur d'onde de la lumière. Un spectre de dichroïsme circulaire (spectre CD) est obtenu en balayant une solution de protéine à des longueurs d'onde variant habituellement entre 350 nm (UV proche) et 190 nm (UV lointain). Les trois structures secondaires retrouvées dans les protéines, l'hélice  $\alpha$ , le feuillet  $\beta$  et la pelote statistique, possèdent des spectres très caractéristiques (figure 23). Ces spectres sont obtenus pour des structures secondaires pures. Pour l'hélice  $\alpha$ , le spectre présente 2 minima, un à 222 nm et un à 208 nm en plus d'un maximum à 190 nm. Pour le feuillet  $\beta$ , le spectre présente un minimum à 218 nm et un maximum à 195 nm et le spectre de la structure aléatoire « random coil » présente un minimum à 198 nm. Les unités sont converties en ellipticité molaire moyenne par résidu « Mean residue weight (MRW) ellipticity » selon la formule :

$$[\theta]_{\text{MRW}} = [\theta] \cdot \text{MRW} / (10 \cdot c \cdot l)$$

où  $[\theta]_{MRW}$  est l'ellipticité molaire moyenne par résidu en  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ,  $[\theta]$  est l'ellipticité en degrés, MRW est la masse moléculaire moyenne des résidus de la protéine,  $c$  est la concentration de l'échantillon en g/mL et  $l$  est l'épaisseur de la cuvette en cm (JOHNSON, 1990). Grâce à cette transformation, le signal obtenu n'est plus relatif à la concentration de l'échantillon. Il est possible de déterminer la quantité de structure secondaire présent dans l'échantillon à l'aide d'une formule développée par CHEN *et al.* en 1976. Cette formule permet de déterminer la valeur maximale que nous pouvons atteindre en ellipticité molaire moyenne par résidu selon la longueur en acide aminé de la protéine. Par la suite, il est possible de déterminer le pourcentage de structure de l'échantillon en faisant le rapport de la valeur observée sur la valeur maximale.

La stabilité thermodynamique est évaluée en suivant la dénaturation de la structure de la protéine en fonction de la température. Lors de la dénaturation thermique, la longueur d'onde est fixée à une valeur correspondant à la structure étudiée et la température est augmentée lentement jusqu'à ce que la protéine ait complètement perdu cette structure maintenant devenue en structure aléatoire. Par exemple lors de nos dénaturations thermiques, nous allons suivre la perte de structure en hélice  $\alpha$  de nos protéines à 222 nm puisque notre protéine contient seulement de l'hélice  $\alpha$  et de la structure aléatoire (FERRE D'AMARE *et al.*, 1993). Il n'y a aucune interférence du spectre de structure aléatoire à 222 nm ce qui permet de suivre seulement la perte d'hélice  $\alpha$ . Par la suite, on peut simuler les courbes de dénaturation à l'aide de modèles thermodynamiques (section

2.4.2) permettant de déterminer les paramètres de stabilité thermodynamique ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $T^\circ$ ) de la dénaturation et de la protéine étudiée.

La seconde spectroscopie est la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire en phase liquide multidimensionnelle et multinucléaire. Cette spectroscopie a été utilisée pour évaluer le contenu de structure de la protéine p21 Max. Lors de cette étude, un type d'expérience a surtout été utilisé et il s'agit d'une expérience 2D nommée  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-TROSY. Brièvement, cette expérience permet de distinguer chaque N-H de chaque acide aminé. Selon leur environnement chimique, chaque N-H aura un déplacement qui lui est propre ce qui nous permet en quelque sorte d'obtenir une empreinte digitale de la présence de domaines repliés. Cette expérience nous a permis de préciser quel domaine de la protéine p21 Max est replié ce qui est impossible avec la spectroscopie par dichroïsme circulaire.

#### 2.4.1 Détermination de structure secondaire et tertiaire par dichroïsme circulaire

Les mesures prises par dichroïsme circulaire ont toutes été effectuées sur un spectropolarimètre J-810 (Jasco) équipé d'un contrôle de température de type Peltier. L'appareil est calibré régulièrement avec une solution aqueuse d'acide *d*-10-(+)-camphre sulfonique à 290,5 nm. Les échantillons sont analysés à l'aide d'une cellule de quartz ayant un parcours optique de 1.0 mm. Les spectres ont été pris à tous les 0.1 nm à 20°C

de 350 à 195 nm en moyennant une accumulation de 5 spectres. Les spectres sont représentés en ellipticité molaire ( $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ). Les échantillons de protéines ont été dilués à la concentration désirée dans un tampon phosphate (100 mM phosphate (pH 6.8), 100 mM KCl). Pour les études avec l'ADN, celui-ci a été obtenu en chauffant 2 oligonucléotides 5'-d (CCCCCAACACGTGTTGCCTGA) -3' et 5'-d (TCAGGCA ACACGTGTTGGGGG) -3' contenant une séquence E-Box (soulignée) à 95°C et en refroidissant lentement la solution à la température de la pièce. Les spectres avec l'ADN ont été obtenus à 20°C. Lors des études à différents pH, tous les pH ont été ajustés au pH désiré tout en respectant la concentration finale de sel.

#### 2.4.2 Dénaturation thermique suivie par dichroïsme circulaire

Les dénaturations thermiques ont été effectuées de 5 à 95°C en chauffant notre solution de protéine à une vitesse de 1°C/minute. Les dénaturations ont été suivies à 222 nm. Les dénaturations thermiques sont représentées en ellipticité molaire ( $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ). Les échantillons de protéines ont été dilués à la concentration désirée dans un tampon 100 mM phosphate (pH6.8), 100 mM KCl. Pour déterminer la température de dénaturation de l'ADN double brin, une solution contenant 32  $\mu\text{M}$  d'ADN sans protéine a été chauffée à une vitesse de 1°C/minute dans le même tampon que les solutions de protéines. La dénaturation a été suivie à 222 nm. Pour les études de liaison à l'ADN, tous les échantillons ont été préparés en incubant l'ADN double brin et les protéines à une concentration équimolaire pendant 1 heure avant la prise de mesures. Toutes les courbes

de dénaturation avec l'ADN double brin ont été obtenues en soustrayant la courbe obtenue pour l'ADN double brin à la concentration utilisée.

#### 2.4.3 Détermination des paramètres thermodynamiques par simulation des dénaturations thermiques

Les simulations des dénaturations thermiques des homodimères possédant un pont disulfure, Max\* et Max\*VL, ont été effectuées en prenant en compte l'existence d'un état intermédiaire. Les paramètres thermodynamiques  $T^\circ$ ,  $\Delta H^\circ_U(T)$  et  $\Delta C_{pU}$  pour les différentes transitions (N  $\rightarrow$  I et I  $\rightarrow$  U) doivent être déterminés pour obtenir les  $\Delta G^\circ_U(T)$  et les constantes d'équilibre à toutes les températures. Lorsque les différentes constantes d'équilibre ont été déterminées, il est alors possible de calculer la population des différents états ( $P_N(T)$ ,  $P_I(T)$  and  $P_U(T)$ ) à toutes les températures et de simuler les courbes de dénaturations ( $[\Theta]_{222}$  vs. T) en utilisant l'équation 1 :

$$[\Theta](T) = P_N(T) \cdot [\Theta]_N(T) + P_I(T) \cdot [\Theta]_I(T) + P_U(T) \cdot [\Theta]_U(T) \quad (1)$$

où  $[\Theta]_N(T)$ ,  $[\Theta]_I(T)$  and  $[\Theta]_U(T)$  sont les ellipticités molaires à 222 nm pour les états N, I et U à température T, respectivement. Tous ces états ont été assumés comme étant linéaires. En d'autres mots,  $[\Theta]_N(T) = [\Theta]_N(0) - d[\Theta]_N(T)/dT \cdot T$ ;  $[\Theta]_I(T) = [\Theta]_I(0) - d[\Theta]_I(T)/dT \cdot T$  et  $[\Theta]_U(T) = [\Theta]_U(0) - d[\Theta]_U(T)/dT \cdot T$ , où  $[\Theta]_N(0)$ ,  $[\Theta]_I(0)$  et  $[\Theta]_U(0)$

sont les ellipticités molaires à 222 nm à 0°C pour les états N, I et U, respectivement et où  $d[\Theta]_N(T)/dT$ ,  $d[\Theta]_I(T)/dT$  et  $d[\Theta]_U(T)/dT$  sont des pentes constantes. Pour ajouter de la consistance entre les paramètres et pour diminuer les degrés de liberté entre les paramètres à simuler,  $[\Theta]_I(0)$  a été exprimé en termes de  $[\Theta]_N(0)$ ,  $[\Theta]_U(0)$  et  $F_I$ , exprimant la perte totale d'hélice  $\alpha$  pendant la dénaturation de l'état N à I :

$$[\Theta]_I(0) = [\Theta]_N(0) + F_I \cdot ([\Theta]_U(0) - [\Theta]_N(0)) \quad (2)$$

Lorsque la première transition correspond à la dénaturation du domaine LZ, les valeurs de  $F_I$  autour de 66% ont été obtenues. Cette valeur se rapproche énormément du ratio obtenu si on rapporte le contenu en hélice  $\alpha$  du LZ et d'une partie de l'hélice 2 (H2) sur le contenu global d'hélice  $\alpha$  de la protéine. Par contre, lorsque la première transition correspond à la dénaturation du domaine HLH, une valeur de 20% pour  $F_I$  a été utilisée. Encore une fois, cette valeur correspond bien au ratio obtenu si on rapporte le contenu en hélice  $\alpha$  du domaine HLH sur le contenu global d'hélice  $\alpha$  de la protéine. Pour les dimères ayant un lien covalent entre les 2 cystéines en C-terminal, les populations de N, I et U sont données respectivement par :

$$P_N(T) = \frac{1}{1 + K_I(T) + K_I(T) \cdot K_U(T)} \quad (3)$$

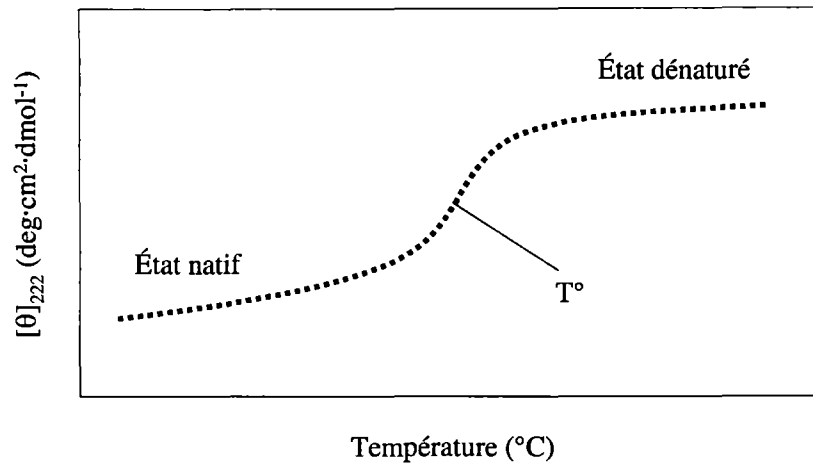


Figure 24 : Diagramme montrant les deux états d'une protéine lors de la dénaturation thermique. L'état natif est caractérisé par une population de structures secondaires, leur disposition dans l'espace et par les liens avec acides aminés voisins. L'état dénaturé représente une population de structures en pelote statistique. Entre ces deux états, nous pouvons observer l'état de transition qui est caractérisé par la présence de la population de l'état natif et de l'état dénaturé. La température de dénaturation ( $T^\circ$ ) est déterminée par le point milieu de cet état de transition et représente dans le modèle à deux états d'une protéine monomérique la température à laquelle les deux populations sont égales. Les populations sont régies par le  $\Delta G$ , qui lui dépend de l'enthalpie et de l'entropie ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ). Ce modèle se complexifie lors de la présence d'états additionnels, nommés états intermédiaires.

$$P_I(T) = \frac{K_I(T)}{1 + K_I(T) + K_I(T) \cdot K_U(T)} \quad (4)$$

$$P_U(T) = \frac{K_U(T) \cdot K_I(T)}{1 + K_I(T) + K_I(T) \cdot K_U(T)} \quad (5)$$

où  $K_I$  est la constante d'équilibre de la transition entre l'état natif et l'état intermédiaire et  
 où  $K_U$  est la constante d'équilibre entre l'état intermédiaire et l'état dénaturé. Chaque  
 terme est exprimés en énergie libre standard de Gibbs :

$$K_I(T) = \exp(-\Delta G_I^\circ / RT) \quad (6)$$

$$K_U(T) = \exp(-\Delta G_U^\circ / RT) \quad (7)$$

La dépendance à la température de l'énergie libre dénaturation standard de Gibbs pour les  
 deux transitions ( $\Delta G_I^\circ(T)$  and  $\Delta G_U^\circ(T)$ ) est donnée par :

$$\Delta G_I^\circ(T) = \Delta H_I^\circ(T_I^\circ) - T \cdot \frac{\Delta H_I^\circ(T_I^\circ)}{T_I^\circ} + \Delta C_{pI} \cdot ((T - T_I^\circ) - \ln(\frac{T}{T_I^\circ})) \quad (8)$$

$$\Delta G_U^\circ(T) = \Delta H_U^\circ(T_U^\circ) - T \cdot \frac{\Delta H_U^\circ(T_U^\circ)}{T_U^\circ} + \Delta C_{pU} \cdot ((T - T_U^\circ) - \ln(\frac{T}{T_U^\circ})) \quad (9)$$



où  $T_I^\circ$  et  $T_U^\circ$  sont les températures de dénaturation (i.e. : où  $\Delta G^\circ_I=0$  and  $\Delta G^\circ_U=0$ ), sont les enthalpies de dénaturation standard van't Hoff à  $T_I^\circ$  et  $T_U^\circ$ .  $\Delta C_{p,I}$  et  $\Delta C_{p,U}$  sont les capacités calorifiques de dénaturation pour les deux transitions. Même si le  $\Delta C_p$  est rapporté comme étant dépendant de la température, il a été estimé comme étant indépendant dans les calculs présentés ici. Cette approximation est faite pour les températures jusqu'à 85°C. La valeur de  $\Delta C_p$  utilisée a été de 0.4 kcal·mol<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup> pour la dénaturation du domaine HLH et de 0.6 kcal·mol<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup> pour la dénaturation du domaine LZ.

Ces valeurs sont représentatives de la taille de chaque domaine.  $\Delta C_p$  a été observé comme le paramètre dont les variations affectaient le moins la simulation. Des variations de l'ordre de 30% n'affectent pas de façon significative les paramètres les plus sensibles ( $\Delta H^\circ_U(T^\circ)$  et  $T^\circ$ ) et conséquemment n'influence pas le  $\Delta G^\circ_U(T)$  et ultimement n'influence pas  $P(T)$ .

Pour Max\*VL/CG et p21 Max VL, Les paramètres thermodynamiques décrivant les transitions entre les états N et I et entre I et U ont aussi été obtenus par la simulation des courbes de dénaturations ( $[\Theta]_{222}$  vs. T) en utilisant un modèle à trois états.  $P_N(T)$  and  $\Delta G^\circ_I(T)$  sont donnés encore par les équations 3 et 8. Par contre, la dissociation de ces deux homodimères en monomères et doit être prise en compte. La seconde transition impliquant le passage de l'état I vers U, ne considère pas seulement la dénaturation du domaine LZ et d'une partie de l'hélice 2 mais aussi la dissociation de l'homodimère en deux monomères ( $K_D$ ). La concentration de protéines, en unité monomérique, ( $pT$ )

devient donc un paramètre important pour les fonctions de  $\Delta G^{\circ}_U(T)$  et  $P_U(T)$  comme décrit dans les équations 10 et 11 :

$$P_U(T) = \frac{-K_D(T) + \sqrt{K_D(T)^2 + 8 \cdot pT \cdot K_D(T)}}{4pT} \quad (10)$$

$$\Delta G^{\circ}_U(T) = \Delta H^{\circ}_U(T_U^{\circ}) - T \cdot \left( \frac{\Delta H^{\circ}_U(T_U^{\circ})}{T_U^{\circ}} + R \cdot \ln(1.66pT) \right) + \Delta C_{pU} \cdot ((T - T_U^{\circ}) - \ln(\frac{T}{T_U^{\circ}})) \quad (11)$$

où  $\Delta C_{p,I}$  et  $\Delta C_{p,U}$  sont les capacités calorifiques de dénaturation pour les deux transitions. Les valeurs utilisées sont les mêmes que celles qui sont utilisées pour la simulation de Max\* et Max\*VL.  $P_I(T)$ , la population de l'état intermédiaire, est seulement donnée par  $1 - P_N(T) - P_U(T)$ . Une fraction intermédiaire ( $F_I$ ) de 20% a été utilisée.

Pour la simulation des dénaturations ( $[\Theta]_{222}$  vs.  $T$ ) de Max\*/CG et p21 Max, les paramètres thermodynamiques ont été obtenus en utilisant un modèle de dénaturation à deux états comme décrit dans l'introduction en utilisant l'équation 12 :

$$[\Theta](T) = (1 - P_U(T)) \cdot [\Theta]_N(T) + P_U(T) \cdot [\Theta]_U(T) \quad (12)$$

où  $[\Theta]_N(T)$  et  $[\Theta]_U(T)$  sont les ellipticités molaires à 222nm à température  $T$  pour les états natif et dénaturé, respectivement.  $P_U(T)$ , la population de l'état dénaturé, est donnée par l'équation 10 et  $P_N(T)$ , la population de l'état natif, est donnée par  $1 - P_U(T)$ . La dépendance de l'énergie libre de dénaturation standard de Gibbs est donnée par

l'équation 11. La capacité calorifique de dénaturation,  $\Delta C_{pU}$ , a été considérée comme la somme des deux capacités calorifiques utilisées dans le modèle à trois états pour la dénaturation des états intermédiaires ( $1.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ). Le  $K_D$  est donné par l'équation 7 en utilisant l'équation 11 pour déterminer  $\Delta G^\circ_U(T)$ .

#### 2.4.4 Ultracentrifugation différentielle

L'ultracentrifugation différentielle a été réalisée par Bradley A. Webb dans le laboratoire de Steven P. Smith.

Les échantillons de protéines utilisés en ultracentrifugation ont été dialysés contre un tampon phosphate, 50 mM phosphate (pH 6.8), 100 mM KCl, qui a été utilisé par la suite comme référence. Toutes les ultracentrifugations ont été effectuées à 20°C. L'analyse de la sédimentation à l'équilibre a été accomplie avec une ultracentrifugeuse analytique Beckman XL-I et un rotor An-60Ti. Les données ont été obtenues à 280 nm en utilisant 3 vitesses de rotor (15 000, 18 000 et 21 000 rpm) et en utilisant 3 concentrations de protéines (0.2, 0.4 et 0.6 mg/mL) pour p21 Max et p21 Max VL. Les mesures d'absorbance ont été prises à tous les 0.002 cm en distance radiale et la prise de 10 mesures a été moyennées. Les données ont été prises lorsque l'équilibre a été atteint. L'atteinte de l'équilibre a été vérifiée par la superposition de la prise de mesures à un intervalle de 2 heures. Le volume spécifique partiel et la densité de la solution ont été

calculés en utilisant le programme SEDNTEERP (version 1.05). Les masses moléculaires pour une interaction monomère-dimère ou pour une espèce monomérique ont été obtenues en utilisant le programme d'analyse XL-A/XL-I (version 6.03, Beckman/Microcal).

Les analyses de vitesse de sédimentation ont aussi été effectuées à 20°C. 50 000 rpm est la vitesse utilisée pour les analyses de vitesse pour p21 Max et p21 Max VL en utilisant les interférences d'optique Rayleigh. Les mesures d'interférence ont été prélevées à toutes les minutes pendant 400 minutes. Les meilleurs profils de simulation basés sur les équations du modèle de Lamn de distribution continue  $c(S)$  provenant de SEDFIT (SCHUCK *et al.*, 2002) ont été superposés aux données expérimentales en utilisant toutes les secondes mesures.

#### 2.4.5 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les protéines, p21 Max et p21 Max VL, ayant servies pour la spectroscopie par RMN ont été uniformément marquées au  $^{15}\text{N}$ . L'induction a été réalisée comme mentionnée précédemment mais en remplaçant le milieu LB par un milieu minimal (M9 :  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Glucose) possédant seulement du  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . Les protéines uniformément marquées sont ensuite purifiées selon la même méthode que les protéines non-marquées et dissoutes dans un tampon phosphate (50 mM phosphate (pH 6.8), 100 mM KCl, 10%  $\text{D}_2\text{O}$  et 50

mM NaN<sub>3</sub>) pour obtenir une concentration de protéines de 1 mM. Toutes les expériences ont été effectuées sur un spectromètre Varian INOVA à une fréquence <sup>1</sup>H de 600 MHz et équipé d'une sonde triple résonance (<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N) à détection indirecte avec une capacité de gradients pulsés selon l'axe des Z. Les expériences 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-TROSY (KAY *et al.*, 1992; WEIGELT, 1998) pour Max\*VL et p21 Max VL ont été obtenus à 45°C. Les spectres ont été accumulés avec 152 transients de 768 points et une fenêtre spectrale avec un incrément t<sub>1</sub> de 200. Le premier incrément du spectre <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-TROSY de p21 Max a été obtenu à 35°C avec 1000 transients de 768 points et ceux de Max\*VL et p21 Max VL a été obtenus à 45°C avec 1000 et 10 000 transients de 768 points, respectivement. Les expériences 1D ont été obtenues à 35°C avec une pré-saturation de la résonance <sup>1</sup>H de l'eau. Toutes les expériences ont été traitées avec les logiciels NMRPipe (DELAGLIO *et al.*, 1995) et NMRView (JOHNSON et BLEVINS, 1994).

#### 2.4.6 Modelage moléculaire

Tous les modelages moléculaires ont été réalisés en utilisant la suite InsightII (Acceleris). Les coordonnées de la protéine et de l'ADN de la structure de Max murin (Myn :E-Box) ont été utilisées (numéro d'accèsion PDB : 1AN2.pdb) pour générer les modèles avec le domaine b-HLH-LZ et la protéine complète. La dénaturation des différents domaines a été accomplie par des simulations de dynamique moléculaire en restreignant la dénaturation à haute température aux domaines désirés et en spécifiant quels domaines doivent demeurer structurés même à haute température. Les représentations moléculaires ont été obtenues à l'aide du logiciel Ribbons (CARSON, 1987).

## **2.5 Analyse de l'activité transcriptionnelle de p21 Max et p21 Max VL sur le promoteur de hTERT**

### 2.5.1 Conditions de culture cellulaire

Toutes les cellules ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu utilisé pour les HCT-116 est le McCoy's medium supplémenté de 10% de sérum foetal de bovin (FBS) et de 1% glutamine. Pour les HT-1080, le milieu utilisé est le EMEM supplémenté de 10% FBS, 1% glutamine, 1mM pyruvate de sodium et 0.1 mM d'acides aminés non essentiels. Finalement, pour les EcR 293, le milieu utilisé est le DMEM supplémenté de 10% FBS, 1% glutamine et de 400 µg/mL de zéocine. Dans le cas des EcR 293 transfectées de façon stable avec les plasmides pIND contenant Max ou Max VL comme insert, le milieu de culture est supplémenté de 400 µg/mL de zéocine et de G418.

### 2.5.2 Transfections cellulaires

#### 2.5.2.1 Transfections stables au DOSPER des cellules EcR 293 avec le vecteur pIND.

La journée avant les transfections stables, les cellules sont trypsinisées et comptées puis elles sont disposées dans les plaques ou pétris de culture pour atteindre une confluence de 60 à 80 % la journée de la transfection. Les différents mélanges (DOSPER/ADN) sont préparés la journée même de la transfection. Le ratio DOSPER :ADN utilisé a été de 6  $\mu\text{L}$  de DOSPER ( $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) pour  $2\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique. Les deux solutions contenant l'ADN (solution A) et le DOSPER (solution B) sont préparées séparément. Le mélange contenant l'ADN (solution A) est effectué en diluant  $2\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique dans  $50\mu\text{L}$  de HBS (20 mM Hepes (pH 7.4) 150 mM NaCl). Puis, la solution contenant le DOSPER (solution B) est effectuée en diluant  $4\mu\text{L}$  de DOSPER ( $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) dans  $50\mu\text{L}$  de HBS (20 mM Hepes (pH 7.4) 150 mM NaCl). Les deux solutions sont combinées et incubées à température de la pièce pendant 15 minutes pour permettre au complexe DOSPER/ADN de se former. Juste avant la transfection, le milieu de culture est remplacé par 1 mL de milieu frais sans antibiotiques. Sans enlever le milieu de culture frais,  $200\mu\text{L}$  du complexe ADN/DOSPER sont ajoutés goutte à gouttes. Le tout est ensuite mélangé en agitant doucement la plaque ou le pétri de culture. Les cellules sont alors incubées pour 4 à 6 heures à  $37^\circ\text{C}$  dans l'incubateur. Après l'incubation, le mélange (milieu de culture/ADN/DOSPER) est remplacé avec du milieu de culture frais avec sérum. La sélection des clones stables est effectuée en augmentant graduellement la concentration de G418 dans le milieu. Les clones obtenus sont séparés et cultivés individuellement et l'expression de Max WT et Max VL suite à l'ajout de ponastérone a été analysée pour chaque clone par immunobuvardage de type western.

#### 2.5.2.2 Transfections transitoires au PEI des cellules EcR 293, HT-1080 et HCT-116 avec les vecteurs pGL2, pGL2-hTERT, pCDNA3.1 et pEGFP.

La journée avant les transfections transitoires, les cellules sont trypsinisées et comptées puis elles sont disposées dans les plaques ou pétris de culture pour atteindre une confluence de 30 à 50 % la journée de la transfection. Lors de celle-ci, les différents mélanges (PEI/ADN) sont préparés. Le ratio PEI :ADN utilisé a été de 4  $\mu$ L de PEI (1 $\mu$ g/ $\mu$ L) pour 2 $\mu$ g d'ADN plasmidique. Les deux solutions contenant l'ADN (solution A) et le PEI (solution B) sont préparées séparément. Le mélange contenant l'ADN (solution A) est effectué en diluant 2  $\mu$ g d'ADN plasmidique dans 100  $\mu$ L d'OPTIMEM. Puis, la solution contenant le PEI (solution B) est effectuée en diluant 4  $\mu$ L de PEI (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) dans 100  $\mu$ L d'OPTIMEM. Les deux solutions sont combinées et incubées à température de la pièce pendant 15 minutes pour permettre au complexe PEI/ADN de se former. Juste avant la transfection, le milieu de culture est remplacé par 800  $\mu$ L de milieu frais sans antibiotiques. Sans enlever le milieu de culture frais, 200  $\mu$ L du complexe ADN/PEI sont ajoutés goutte à gouttes. Le tout est ensuite mélangé en agitant doucement la plaque ou le pétri de culture. Les cellules sont alors incubées pour 4 à 6 heures à 37 °C dans l'incubateur. Après l'incubation, le mélange milieu de culture/ADN/PEI est remplacé avec du milieu de culture frais avec sérum. L'analyse des transfections transitoires est effectuée 24 ou 48 heures post-transfection.



### 2.5.3 Induction de l'expression de Max WT et Max VL dans les EcR 293

Les cellules EcR 293 (Invitrogen) expriment de façon constitutive le récepteur fonctionnel à l'ecdysone provenant du plasmide pVgRXR. Le maintien de l'intégration du plasmide et de l'expression du récepteur se fait par l'ajout de zéocine au milieu de culture. Le récepteur à l'ecdysone est un récepteur nucléaire et peut être activé par l'ajout de ponastérone A au milieu de culture. La ponastérone A est un analogue de l'ecdysone, une hormone stéroïdienne qui régule la métamorphose de *Drosophila melanogaster*. L'ajout de ponastérone A permet la translocation du récepteur à l'ecdysone au noyau. Par la suite, les récepteurs lient les éléments de réponse à l'ecdysone/glucocorticoïdes situés sur le plasmide pIND contenant nos ADNc de Max WT et Max VL avec une séquence hemagglutinine (HA). Le résultat final est l'expression de Max WT et Max VL avec une séquence HA permettant leur détection par immunobuvardage de type western.

### 2.5.4 Essais luciférase

Le système rapporteur utilisant la réaction luciférine-luciférase *in vitro* est employé ici pour mesurer l'effet de l'expression de HA Max et HA Max VL sur l'activité transcriptionnelle du promoteur de hTERT. Pour utiliser ce système, le plasmide (pGL2-hTERT) comportant le promoteur de hTERT (fragment -1226 pb à +438 pb) placé en amont du gène de la luciférase (fourni par le Dr Ralf Janknecht) a été utilisé. Pour être en

mesure de vérifier l'effet de HA Max et HA Max VL sur l'activité transcriptionnelle de hTERT, pGL2-hTERT a été co-transfecté dans les différentes souches de cellules avec les plasmides pCDNA3.1, pCDNA3.1-HAMax ou pCDNA3.1-HAMax VL. Comme contrôle, le plasmide pGL2 ne contenant aucun promoteur (pGL2) a lui aussi été co-transfecté dans les différentes souches de cellules avec les plasmides pCDNA3.1, pCDNA3.1-HAMax ou pCDNA3.1-HAMax VL. L'effet de l'expression de HA Max et HA Max VL sur l'activité du promoteur de hTERT a ensuite été analysé à différents temps post-transfection en mesurant l'activité de la luciférase. Pour ce faire, le milieu de culture des cellules est enlevé, les cellules sont lavées et récoltées avec 1 mL de PBS (4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl et 137 mM NaCl). Les cellules sont culottées par une brève centrifugation et le PBS est retiré. Les cellules sont ensuite lysées dans un tampon de lyse (Promega; 25 mM Tris-phosphate (pH 7.8), 2 mM DTT, 2 mM acide 1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacétique, 10 % glycérol, 1% Triton X-100). L'homogénat est centrifugé 1 minute à 13 000 rpm à 4°C. Le surnageant (extrait cellulaire) est récolté et conservé pour analyse. Pour effectuer la réaction de luciférase, 20 µL d'extrait cellulaire sont mélangés avec 100 µL de tampon de réaction (Promega). La lumière produite par la réaction est détectée à l'aide d'un luminomètre (EG&G Berthold).

#### 2.5.5 Dosage de protéines

Pour effectuer l'analyse de l'expression des protéines par immunobuvardage de type western, la quantité de protéines de chaque échantillon doit être connue. Les cellules sont

prélevées et lavées avec du PBS à différents temps après transfection. Ensuite, les cellules sont brièvement centrifugées et le PBS est retiré. Les cellules sont alors resuspendues dans un tampon Laemmli (50 mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 100 mM DTT, 10 % glycérol, 0.05% bleu de bromophénol) et lysées par sonication. L'homogénat est ensuite chauffé à 95°C pendant 3 minutes puis, il est congelé à -80°C. Pour le dosage, 5-10 µL de l'homogénat sont précipités en ajoutant 100 µL d'acide trichloroacétique 20% et en laissant incuber le mélange 30 minutes à 4°C. La solution est centrifugée à 13 000 rpm pendant 10 minutes à température de la pièce. Le culot est resuspendu dans 100 µL de NaOH 0.1N. Ensuite, 1 mL de solution A est ajouté aux 100 µL de protéines. Cette solution est incubée 10 minutes à température de la pièce et par la suite, 100 µL de réactif de Folin sont ajoutés. Le mélange est incubé 30 minutes à température de la pièce et finalement la D.O.<sub>630nm</sub> est prélevée. Pour déterminer la concentration, la solution est comparée à une courbe standard comportant différentes concentrations de BSA.

#### 2.5.6 Immunobuvardage de type Western

Pour l'analyse, les échantillons ayant servi pour le dosage sont dégelés et 25 µg de protéines sont utilisés pour faire l'électrophorèse sur gel d'acrylamide SDS (voir section dosage de protéines). Les protéines sont ensuite transférées à 100V pendant 1 heure et fixées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un tampon de transfert (100 mM Tris, 767 mM glycine, 25% méthanol). La qualité du transfert est ensuite analysée avec une coloration de la membrane au rouge de ponceau (0.5% rouge de ponceau, 1% acide

acétique). La membrane est lavée au TBS (100 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl), puis elle est bloquée pour prévenir l'hybridation non spécifique des anticorps avec une solution de TBS-Tween (0.05%) pendant toute une nuit à 4°C avec agitation sur Nutator (Clay Adams). La membrane est alors incubée 1 à 2 heures à température de la pièce avec une solution de TBS-Tween contenant l'anticorps primaire spécifique à la protéine que l'on désire analyser. La membrane est par la suite lavée 3 fois à température de la pièce avec une solution de TBS-Tween. La membrane est ensuite incubée 45 minutes à température de la pièce avec une solution de TBS-Tween contenant l'anticorps secondaire, couplé à la peroxydase, spécifique à l'anticorps primaire. Finalement, la membrane est à nouveau lavée 3 fois avec une solution de TBS-Tween et l'immunobuvardage est révélé par chemiluminescence à l'aide d'un auto-radiogramme.

#### 2.5.7 Localisation cellulaire de c-Myc, p21 Max et p21 Max VL par immunofluorescence

Pour localiser c-Myc, HA-Max et HA-Max VL dans les cellules HCT-116 et HT-1080 par immunofluorescence, les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre. Les lamelles sont lavées avec du PBS puis, les cellules sont fixées pendant 20 minutes avec une solution de PBS contenant 3.7% de paraformaldéhyde. La réaction de fixation est arrêtée en lavant les lamelles 3 fois 10 minutes avec une solution de PBS contenant 100 mM Glycine. Les cellules sont perméabilisées avec une solution de PBS contenant 0.5% de Triton X-100 pendant 5 minutes. Les cellules sont bloquées avec une solution de PBS contenant 2% de BSA pendant 60 minutes. Les cellules sont ensuite incubées en présence

de l'anticorps couplé au fluorophore (Alexa-Fluor 594 pour l'anti-HA et FITC pour l'anti-c-Myc).

#### 2.5.8 Mesure de l'activité télomérase par essais TRAP

Après l'induction de Max et Max VL dans les EcR 293, l'activité de la télomérase a été mesurée par essai TRAP (Protocole d'amplification de répétitions télomériques) (Intergen) (figure 25). Donc, après l'induction, les cellules sont récoltées, puis lavées avec du PBS. Les cellules sont centrifugées et le surnageant est enlevé. À ce stade, le culot de cellules peut être conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pour l'essai TRAP, le culot est resuspendu dans un tampon de lyse (10 mM Tris (pH 7.5), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 0.1 mM benzamidine, 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0.5% CHAPS, 10% glycérol) contenant des inhibiteurs de RNAses (RNAGuard, Pharmacia). La lyse est effectuée sur glace pendant 30 minutes. Par la suite, l'homogénat est centrifugé pendant 20 minutes à 12 000g à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant est transféré et la concentration de protéines est déterminée. Avant de procéder à la réaction de l'essai TRAP, l'oligonucléotide TS (Intergen) est radiomarké au  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP. Pour ce faire, l'oligonucléotide TS est incubé en présence de  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP (3000 Ci/mmol; 10 Ci/ml) et de T4 polynucléotide kinase (Promega) pendant 20 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$ . L'oligonucléotide est ensuite purifié sur colonne MicroSpin G-25 (APB). Maintenant, pour l'essai TRAP, chaque échantillon de cellules est incubé en présence du tampon de réaction d'essai TRAP (Intergen), de dNTP (Intergen), de l'oligonucléotide  $^{32}\text{P}$ -TS, d'un oligonucléotide inverse nécessaire pour l'amplification par PCR et de Taq polymérase (5U/ $\mu\text{L}$ ). La réaction a lieu pendant 30 minutes puis est amplifiée par PCR

(27 cycles : 94°C/30 secondes, 59°C/30 secondes). Les réactions sont ensuite analysées sur gel d'acrylamide non-dénaturant 12.5%. Le gel est séché puis révélé par autoradiogramme avec un film Kodak BIOMAX après 1 heure d'exposition. Au besoin, l'exposition peut être prolongée jusqu'à une nuit.

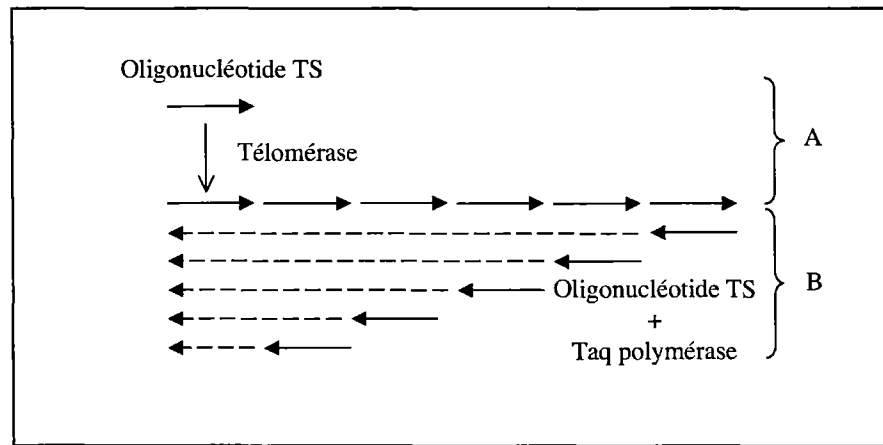


Figure 25 : Protocole d'amplification de répétitions télomériques (essai TRAP). La première étape implique l'élongation par la télomérase de l'oligonucléotide TS qui simule le bout des télomères (A). La seconde étape utilise un oligonucléotide dont la séquence est complémentaire à la répétition télomérique et une réaction de polymérisation a lieu avec la Taq polymérase (B).

## RÉSULTATS

### **3.1 L'augmentation de la stabilité du leucine zipper de Max augmente la stabilité du complexe b-HLH-LZ : E-Box.**

**Chapitre publié dans Journal of Molecular Biology (2003) 326(5): 1577-95.**

#### **Contribution personnelle :**

#### Manipulations :

J'ai fait le clonage du domaine b-HLH-LZ de Max dans un vecteur d'expression procaryotique et j'ai effectué la double mutation à l'intérieur du domaine leucine zipper par mutagenèse dirigée par PCR. Par la suite, j'ai procédé à l'expression de ces deux protéines dans une souche de bactérie, les BL21 pLysS pour les purifier par FPLC sur colonnes cationiques. Les échantillons de protéines purs ont été lyophilisés et resuspendus dans un tampon permettant l'analyse par spectroscopie de dichroïsme circulaire. J'ai effectué toutes les analyses de spectroscopie de dichroïsme circulaire. M. Frédéric Gagnon a pour sa part développé tout le modèle mathématique permettant l'analyse thermodynamique ainsi qu'une section concernant des résultats obtenus en fluorescence qui étaient présents lors de la soumission initiale du manuscrit mais qui ont été retirés par la suite. M. Frédéric Gagnon a aussi écrit la partie concernant le modèle mathématique lors la rédaction du manuscrit avec l'aide et la supervision de Dr. Pierre



Lavigne. De façon plus détaillée, ma contribution se reflète dans la publication par la production des figures 1 a-b, 2 a-d, 3 a-d, 5 a-d, 8 a-d et 9a-b. Frédéric Gagnon a pour sa part simulé les courbes obtenues à la figure 3 a-d permettant l'analyse thermodynamique donnant les valeurs (ex. :  $\Delta H^\circ$  et  $\Delta G^\circ$ ) ont été rapportées des tableaux 1 et 2. Cette même simulation a permis d'avancer les différents modèles illustrés à la figure 4 provenant de l'analyse des populations de la figure 6 a-d et 8 a-d.

#### Rédaction de l'article :

J'ai participé à 60% à l'écriture de l'article avec l'aide et la supervision de Dr. Pierre Lavigne, j'ai assemblé et produit toutes les figures et les tableaux ainsi que participé à 33 % pour la génération des modèles.

#### **Pertinence de l'article dans le projet de recherche :**

Les objectifs du projet de recherche de cette thèse étaient l'analyse de la dimérisation de Max pour déterminer si celui-ci pouvait homodimériser *in vivo* et la caractérisation de l'inhibition des fonctions d'activation de la transcription de l'hétérodimère c-Myc/Max lors de la surexpression de Max. L'article qui suit est la première étape du projet de recherche permettant de vérifier si l'histidine présente dans le domaine leucine zipper de Max est un résidu important dans la déstabilisation de ce domaine tel qu'avancé par Dr. Pierre Lavigne en 1995. Cette caractérisation structurale et thermodynamique nous a permis de vérifier que ce résidu est non seulement responsable de la déstabilisation du

domaine leucine zipper mais aussi de tout le domaine b-HLH-LZ. De plus, cette analyse nous permet de déterminer la constante de dissociation du domaine b-HLH-LZ de type sauvage et mutant. La diminution de la constante de dissociation due à la mutation de cette histidine nous permet donc de croire que notre mutant pourrait homodimériser plus efficacement *in vivo*. Selon notre hypothèse de départ, cette meilleure homodimérisation devrait résulter en une plus grande inhibition de l'activation de la transcription menée par l'hétérodimère c-Myc/Max *in vivo*.

*Running title:* Engineering of Max b-HLH-LZ:E-Box Complexes with Improved Stability

**Improving the Thermodynamic Stability of the Leucine Zipper of Max Increases the Stability of its b-HLH-LZ:E-Box complex**

Naud Jean-François<sup>\*1</sup>, Gagnon Frédéric<sup>\*2</sup>, Wellinger Raymund<sup>1</sup>, Chabot Benoit<sup>1</sup>, and Pierre Lavigne<sup>2+</sup>

\*These authors are the major contributors and have contributed equally.

<sup>1</sup>Département de Microbiologie et Infectiologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

<sup>2</sup>Département de Pharmacologie, Institut de pharmacologie de Sherbrooke, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

All correspondence should be addressed to:

<sup>+</sup>Dr. Pierre Lavigne  
 Département de pharmacologie  
 Faculté de médecine  
 Université de Sherbrooke  
 3001 12<sup>e</sup> ave nord  
 Sherbrooke  
 Quebec, Canada  
 J1H 5N4  
 Phone: 819-820-6868 ext.: 15462  
 Fax: 819-564-5400

E-mail: [pierre.lavigne@usherbrooke.ca](mailto:pierre.lavigne@usherbrooke.ca)

## Summary

Max is a member of the b-HLH-LZ (basic region-helix1-loop-helix2-leucine zipper) family of eukaryotic transcription factors. It is the obligate partner of the related b-HLH-LZ proteins, c-Myc and Mad1, with which it forms heterodimers on target DNA. While c-Myc and Mad1 require Max for DNA-binding, Max itself can form a homodimer that recognizes E-Box DNA sequences (CACGTG) in gene promoters that are targeted by c-Myc. Evidence suggests that this mode of binding by Max may repress c-Myc transcriptional activity, and this may have applications in the control of the aberrant activity of c-Myc during certain oncogenic transformations. To enhance this repressive potential of Max, we sought to stabilize Max homodimers. We have designed a double mutant (N78V/H81L) located in the coiled-coil interface of the Leucine Zipper domain and we demonstrate that these mutations do indeed increase the stability of the protein. The mutations also improve the stability of the complex with cognate DNA. Thermal denaturations monitored by circular dichroism reveal two transitions that are due to intermediate folding states for both the wild type and mutant proteins; this is supported by detailed thermodynamic analyses. A formalism to characterize the temperature dependency of the unfolding, including the effect of intermediates, is presented.

*Keywords:* Max, b-HLH-LZ, E-Box, protein-DNA complex, circular dichroism, protein stability.

*Abbreviations used:* b-HLH-LZ, basic region-helix-loop-helix-leucine zipper; CD, circular dichroism; D-Ns, dominant-negatives; EMSA, electro-mobility shift essay; H1, helix 1; H2, helix 2; HAT, histone acetyl transferase; HDAC, histone deacetylase;  $[\theta]$  or  $\Theta$ , mean residue ellipticity; O.D.<sub>600 nm</sub>, optical density at 600 nm; PCR, polymerase chain reaction; SID, Sin3 interacting domain; TAD, transcription activating domain; T<sup>°</sup>, temperature of unfolding; WT, wild-type; 1 cal = 4.184 J

## Introduction

Max is a basic region-helix-loop-helix-leucine zipper (b-HLH-LZ) protein that belongs to a network of transcription factors, which includes the Myc and Mad families of protein<sup>(1-4)</sup>. Max can form a homodimer and binds specifically to E-Box DNA sequences (CACGTG)<sup>(5)</sup>. To bind DNA (E-Box sequences) and play their roles as transcriptional regulators, the members of the Mad and c-Myc families must heterodimerize with Max. As a complex with Max, c-Myc is implicated in cell transformation, differentiation and apoptosis<sup>(2)</sup>. Transactivation by c-Myc occurs *via* its transactivating domain or TAD<sup>(6-8)</sup>. More specifically, it requires a conserved element in the TAD, the so-called Myc box II (MBII)<sup>(9)</sup>. MBII is a small element that interacts with TRRAP, a large protein that appears to function as a coactivator<sup>(7,9)</sup>. TRRAP is part of at least two large protein complexes that possess HAT activity, one containing GCN5/PCAF the other Tip60/NuA4<sup>(10-12)</sup>. The mechanism by which c-Myc activates transcription is closely related to the HAT activity that opens up the chromatin in the promoter region of its target genes. Max has also been shown to heterodimerize specifically with the proteins of the Mad family (Mad1, Mxi1, Mad3, Mad4), Mad1 being the most thoroughly characterized<sup>(13-15)</sup>. Members of the Mad family act as antagonists of c-Myc. When Mad1 is associated with Max and bound to E-Box sequences in the promoters of target genes, the heterodimer represses the transcription by recruiting other nuclear factors like mSIN3 and HDAC<sup>(15,16)</sup>. Mad1 recruits the repressor complex *via* its SID domain that interacts with mSin3. Like TRRAP, mSin3 can function as a platform for additional

proteins <sup>(7,9)</sup> that collaborate to close the chromatin in the promoter region of the c-Myc target genes and to their transcription <sup>(7)</sup>. The Max protein is long lived and expressed at a nearly constant level during the cell cycle. Conversely, c-Myc and Mad1 are short-lived proteins and their levels are highly regulated during the cell cycle. So the cellular activities of c-Myc and Mad1 are thought to be controlled by the level and temporal pattern of expression of their corresponding genes <sup>(2,7,17)</sup>.

The association of Max with its partners occurs through the heterodimerization of their HLH-LZ domains. The crystal structure of the murine Max (Myn) homodimer bound to its cognate DNA sequence revealed that the HLH domains fold into a parallel four-helix bundle, that LZ domains fold as a parallel two-stranded  $\alpha$ -helical coiled-coil and that basic domains bind in the E-Box major grooves as  $\alpha$ -helices <sup>(18)</sup>. In previous studies, it was suggested that the LZ domains of these proteins were responsible for the specific heterodimerization or molecular recognition of Myc and Mad proteins <sup>(19,20)</sup>. In the same studies, molecular models describing interhelical salt bridges and hydrogen bonds that might be responsible for the specificity of Max and c-Myc LZ heterodimerization were described <sup>(19,20)</sup> and confirmed by the determination of the NMR solution structure of the c-Myc-Max heterodimeric LZ <sup>(21)</sup>. This structure revealed the existence of a specific interaction at the interface of the heterodimeric LZ between the His **81d** on the Max LZ and the two Glu residues, positions **410a** and **417a** respectively, on the c-Myc LZ. This specific interaction is proposed to play a crucial role in the molecular recognition of the c-Myc and Max LZs as well as the complete gene products. A similar interaction can be predicted to occur at the interface of all the Max partners as an acidic side-chain at the

same position as one of those forming a specific salt-bridge (**410a**) with His **81d** on the Max LZ is conserved throughout the Mad and c-Myc families. While playing a crucial role in the molecular recognition of c-Myc LZ, the His **81d** (along with two conserved Asn residues at positions **a** found at the interface of the Max LZ is proposed to contribute to promote the dissociation the Max homodimer <sup>(21)</sup>. Indeed, Max homodimer must dissociate *in vivo* in order to heterodimerize with its partners. Therefore, the stability of the Max homodimer must not be too high. Indeed, a Max homodimer that would be too stable would have a low probability of existing as a monomer and hence to heterodimerize with its partners. Recently, Tchan & Weiss have demonstrated that Asn **78a** and His **81d** are involved individually in destabilizing the Max HLH-LZ homodimer <sup>(22)</sup>.

Because of the oncogenic properties of c-Myc, general and specific methods have been developed to produce dominant-negatives (D-Ns). One method consisting of deleting the transactivation domain of c-Myc leading to a protein able to heterodimerize with Max and bind DNA but unable to activate transcription has been described <sup>(23)</sup>. Another approach consists in the deletion of the basic domain <sup>(24)</sup> leading to proteins that would heterodimerize with endogenous factors and prevent DNA binding. On the other hand, in order to overcome the effect of the endogenous factors, these D-Ns need to be overexpressed. To avoid the overexpression, another method was devised in order to produce potent D-Ns active at low concentrations in the transfected cells. This method consists in replacing the basic region of Max by an acidic region <sup>(25)</sup>. It has been shown that this type of D-N can heterodimerize with c-Myc with a much better affinity leading



to D-N-c-Myc complexes that are highly stable and that cannot bind DNA. Finally, it was also demonstrated that transcriptional activities of c-Myc could be overcome just by the expression of Max<sup>(26)</sup>. Simply based on the law of mass action, improving Max homodimer stability should result in a more stable Max:E-Box complex and therefore compete more efficiently with the endogenous c-Myc-Max heterodimer to reduce its transcriptional activities.

We describe here our results on the engineering of a highly stable Max b-HLH-LZ homodimer. A previous study has shown that mutations N78V or H81L done individually on the HLH-LZ of Max increase the melting temperature of the homodimer but no further thermodynamic characterization was carried out and no DNA binding affinity were determined since the basic domain was absent<sup>(22)</sup>. In addition, highly stable Max homodimers should not readily dissociate and heterodimerize c-Myc in the promoters of target genes. In this study, we show that the N78V/H81L double mutation leads to a dramatic increase in the stability of the b-HLH-LZ of Max and leads to the formation of more stable complex with E-Box sequences as hypothesized. We also show that the HLH and LZ domains can unfold independently, leading to an intermediate between the native and denatured states. A formalism to simulate the temperature denaturation curves with the population of an intermediate state is also presented.

## ***Results and Discussion***

### **Protein engineering**

Max homodimeric b-HLH-LZ is not highly stable<sup>(25,27)</sup>. Previous studies have suggested that the marginal stability for the Max homodimer was caused by the presence of the His **81d** and the occurrence of two Asn at positions **a** of the LZ domain<sup>(21,22)</sup>. Therefore, in order to improve the stability of the homodimeric Max HLH-LZ, a double mutant of the b-HLH-LZ domain of Max was made by replacing the Asn **78a** by a Val and the His **81d** by a Leu (Figure 1a). These two replacements were made in order to increase the hydrophobic core of the dimerization interface of the LZ. It is important to note that Asn residues are conserved at positions **a** in LZ domains<sup>(28)</sup>. Their role is to decrease the stability of dimers in order to favor dissociation and to prevent oligomerization (formation of trimers or tetramers)<sup>(28)</sup>. In this perspective, the Asn at position **92a** was kept (Figure 1a). A disulfide bridge at the C-terminus has been added to cross-link the two monomers in order to prevent dissociation and the concentration dependency of the population of the dimer as well as optimizing the stability of the dimers. These two constructions are named Max\* and Max\*VL (Figure 1a). We have also replaced the Cys of Max\* and Max\*VL by a Gly in order to study the effect of the disulfide bond onto the stability, the oligomerization state and DNA binding of Max\* and Max\*VL. These two constructions are named Max\*/CG and Max\*VL/CG (Figure 1a).

### ***Secondary and tertiary structures of the different Max b-HLH-LZ variants***

To characterize the overall structure of the different variants, the four recombinant b-HLH-LZs were analyzed by far-ultraviolet circular dichroism (CD) spectropolarimetry at

20°C and pH 6.8. Max\*, Max\*VL, Max\*/CG and Max\*VL/CG depict CD spectra typical of  $\alpha$ -helical proteins with the typical double minimum in mean residue molar ellipticity ( $[\Theta]$ ) at 208 and 222 nm (Figure 2a-d). Moreover, the  $[\Theta]_{222}/[\Theta]_{208}$  ratios for the four recombinant proteins are greater than unity, suggesting the presence of interacting helices and stable tertiary interactions in a coiled-coil conformation <sup>(29)</sup>. For proteins of 87 residues, the theoretical mean residue molar ellipticity at 222 nm ( $[\Theta]_{222}$ ) for 100%  $\alpha$ -helical content is  $-38,000 \text{ mdeg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  <sup>(30)</sup>. The  $[\Theta]_{222}$  of Max\*, Max\*VL and Max\*VL/CG is about  $-22,000 \text{ mdeg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  indicating that Max\*, Max\*VL and Max\*VL/CG are approximately 60% helical. The difference in ellipticity between the theoretical and experimental values is likely due to an unfolded basic region in the absence of DNA <sup>(27,31)</sup>, the loop domain and the Cys tail (GSG(C/G)) at the c-terminal end. Based on the crystal structure of the murine Max homodimer bound to a E-Box sequence, an unfolded basic region, the loop and the linker would each account to 20, 10 and 5% of the helical content and the remaining (HLH and LZ) for 65% (Figure 1B). Therefore it appears that Max\*, Max\*VL and Max\*VL/CG have folded LZ and HLH domains and an unfolded b region. Under these conditions (pH 6.8 and 32  $\mu\text{M}$  in dimer units) it therefore seems that Max\*VL/CG exists in a population of 100% of homodimer. In contrast, Max\*/CG, has a helical content of 42% ( $[\Theta]_{222} = -16,000 \text{ mdeg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ) which seems to indicate that Max\*/CG does not exist in a population of 100% dimer (the monomeric and unfolded state is populated) or that the native dimer is less helical under the same conditions.

### *Thermodynamic stability of the Max b-HLH-LZ variants*

#### **Existence of intermediate states**

In order to characterize the effect of the mutations and the disulfide bond on the stability of the tertiary/quaternary structures of the different b-HLH-LZ of Max, the temperature-induced denaturation of each variant was recorded by monitoring  $[\Theta]_{222}$  as a function of temperature at pH 3.8 and 6.8 (Figure 3a-d). In the case of Max\*, the denaturation curve at pH 6.8 (Figure 3a) is suggesting a simple two-state unfolding reaction with an apparent  $T^\circ$  of 51°C. Conversely for Max\*VL, the denaturation curve (Figure 3b) clearly shows the occurrence of two consecutive transitions with apparent  $T^\circ$  values of 59°C and 81°C respectively, suggesting the existence of an intermediate state between the native and unfolded states

The apparent loss in  $\alpha$ -helical content of the Max\*VL for the first transition corresponds to approximately 20% of the total helical content, a value close to what is expected for the unfolding of H1 and part of H2 of the HLH domain ( $K_I$  on Figure 4a). The second transition most likely corresponds to the unfolding of the LZ domain and part of H2 ( $K_U$  on Figure 4a). In order to further test the hypothesis that the HLH and LZ domains can unfold independently in Max\*VL, we have performed a temperature denaturation of Max\* at pH 3.8 (Figure 3a). Since Max\* still has the His **81d** in the LZ, decreasing the pH from 6.8 to 3.8 should decrease the stability of the LZ as the population of the protonated state of His **81d** side-chain should increase significantly. This should lead to

unfavorable desolvation effects and repulsions <sup>(21,32)</sup> at the interface of the LZ domain. If the decrease in stability compared to the HLH domain is important, then two conformational transitions should be observed (Figure 4b). As hypothesized (Figure 3a), one can clearly see the presence of two consecutive transitions. The first transition with an apparent  $T^\circ$  of 36°C accounts for approximately a loss of 60% of the total helical content, a figure very close for what one would expect for the unfolding of the LZ domain and part of the contiguous H2 (Figure 4b). The second transition, with a  $T^\circ$  of 60°C is close to the one ascribed to the HLH domain of Max\*VL (Figure 4b). This result indicates that the HLH and LZ domains of Max\* and Max\*VL and in the complete gene product can unfold independently.

At pH 3.8, the temperature denaturation of Max\*VL shows again two transitions. The  $T^\circ$  of the two transitions are increased by 2 and 4°C respectively (Table 1). This also indicate that the intermediate state is the same at pH 3.8 and 6.8 (Figure 3b, Figure 4a). The increase in  $T^\circ$  indicates that both domains appear to be stabilized at lower pH. Dimeric LZs have been reported to be more stable at acidic pHs <sup>(33)</sup>. This result has been rationalized from the fact that protonation of Asp/Glu side-chains involved in e-g (*i* to *i*+5) interhelical salt-bridge lowers the free energy cost of desolvation at the interface of the LZ domain <sup>(32)</sup>. Two e-g (*i* to *i*+5) interhelical salt-bridges are predicted to exist at the interface of the dimeric LZ of Max. Indeed, Asp 84g and Arg 89e are predicted to form two e-g (*i* to *i*+5) interhelical salt-bridges at the interface of the LZ domain <sup>(19)</sup>. Protonation of the Asp side-chains could therefore be responsible for the apparent

stabilization of the LZ of Max\*VL at lower pH. The apparent increase in stability of the HLH domain could come from a cooperative effect as discussed below.

Max\*/CG and Max\*VL/CG temperature denaturation curves at 32  $\mu$ M (dimer units) and pH 6.8 and 3.8 are shown on Figure 3c and d. Interestingly, the temperature denaturation curve for Max\*/CG at both pH 6.8 and 3.8 appear to be two-state. On the other hand, one can see that similarly to Max\*VL, two transitions are also observed for Max\*VL/CG (Figure 3d). The two transitions are also more apparent at pH 3.8. It is interesting to observe that the two transitions are moved to higher apparent  $T^\circ$  values. As discussed above the apparent stabilization of the LZ domain at lower pH could stabilize, through a cooperative effect, the HLH domain.

*Validation of the existence of intermediate states: the two transitions are not caused by oligomerization*

As discussed above, Asn residues at position **a** in the heptad repeat prevents the oligomerization (dimer, trimer ...) of LZ domains<sup>(28)</sup>. Although we have kept Asn **92a** in Max\*VL, the possibility that latter may oligomerize and that this oligomeric states may be responsible for the existence of the two transitions observed in the temperature denaturation curves has to be explored.

The possible states of aggregation are not infinite. One possibility is the formation of a dimer of Max\*VL as represented in Figure 4c. Increasing the concentration of Max\*VL would increase (by the law of mass action) the population of both fictitious “native” and intermediate states. If the intermediate state is stable, the first transition should be concentration independent (intramolecular) and only the apparent  $T^\circ$  of the second transition would be expected to change with concentration. This is not what we have observed. Indeed, the apparent  $T^\circ$  of both transitions is concentration independent (data not shown). In order to further rule out a potential effect of the C-terminal disulfide bond and the mutations in inducing the formation of dimers of dimers as depicted on Figure 4c, we have performed the temperature denaturation Max\*VL/CG at different concentration (Figure 5b). As seen, for concentrations above 10  $\mu\text{M}$ , Max\*VL/CG displays two transitions associated with the same decrease in helical content as observed for Max\*VL (Figure 3b). This result completely rules out the effect of the disulfide bridge in promoting the formation of a dimer of Max\*VL. The only other possible scenario for oligomerization would be an equilibrium between the monomeric, dimeric and some unlikely higher order oligomerization state caused by the double mutation. Again, increasing the concentration of the Max\*VL/CG would change the population of both the dimer and the other putative state leading to a concentration dependency of both populations and corresponding  $T^\circ$ . We present on Figure 5d the first derivative of the temperature denaturation curves of Max\*VL/CG presented on Figure 5b. The first derivative curves clearly demonstrate that only the  $T^\circ$  (maximum in the curve) of the second transition is dependent on concentration. Therefore, there is only one possible explanation for such behavior: one transition that is intramolecular and one that is

coupled with a dissociative step. As depicted on Figure 4d, the denaturation of the HLH domain, while the LZ is still folded (highly stable intermediate) applies for such an explanation. Therefore, neither the disulfide bond nor the double mutation is responsible for the existence of two transitions in the temperature denaturation of the different variants of Max b-HLH-LZ studied here.

The temperature denaturation curves observed for Max/\*CG only depict one apparent transition even at pH 3.8 where Max\* showed a stable intermediate. Having two monomers cross-linked will increase the local concentration of monomers optimizing the refolding and the probability of having an intermediate, in this case the HLH. In the case where the two chains are not cross-linked, the probability of finding a stable intermediate state become less as its unfolding is associated with a “dilution” or dissociation. Indeed, at the same concentration in dimer units (32  $\mu$ M) and pH6.8, the  $\Delta T^\circ$  between Max\* and Max\*/CG is 14°C (Table 1 and 2). More specifically, the depletion of  $T^\circ$  results from the gain of rotational and conformational degrees of freedom upon dissociation as described in detail elsewhere <sup>(34)</sup>. In a sense, the stabilization of the intermediate state of Max\* could appear as an artifact of the cross-link. But in our opinion though, the two domains can unfold independently but have similar stabilities explaining why we only see one apparent transition as depicted on Figure 4e. In this particular case, it is more difficult to treat the existence of an intermediate state as the two transitions cannot be separated or isolated as for the case of Max\* at pH3.8. As discussed below we were unable to simulate the temperature denaturation curve with a three-state model including an intermediate state. Only the two-state model gave satisfactory results.



*Simulation of the temperature denaturation curves with a three-state unfolding formalism*

In order to estimate the population at all temperatures for the different states of Max\* and Max\*VL, a formalism that can account for the existence of an intermediate state between the native and unfolded states is needed. Such a three-state formalism is described in detail in the Materials and Methods section. On Figure 3 the denaturation curves at pH 3.8 and pH 6.8 of all the Max b-HLH-LZ are shown fitted. The thermodynamic parameters obtained are listed in Table 1 and Table 2.

The populations of the different states of Max\*VL at pH 3.8 and 6.8 are shown in Figure 6b and d respectively. At pH 6.8, one can clearly see the N state transforming into the I state with a  $T^\circ$  of 60°C (where both population are equal to 0.5). We remind that this transition represents the unfolding of the HLH (Figure 4a). One can also see that the population of this intermediate is maximal at 70°C. From this temperature the intermediate state transforms into the denatured state through the unfolding of the LZ (Figure 6d) with a  $T^\circ$  of 80°C (where the population of the I and U states are equal to 0.5). At pH 3.8, the first transition is almost identical to the one at pH 6.8 with a slightly lower  $T^\circ$  of 57°C. The temperature at which the population of I is maximal at pH 3.8 is also very close to the one at pH 6.8. But one can notice that the population of the I state stays close to 100% on a wider range of temperature at pH 3.8 than at pH 6.8, indicating that the intermediate with the LZ and part of the H2 involved in secondary and tertiary interactions is more stable (Figure 6b). Indeed, the curve describing the population of the

U state is moved to higher temperature with a  $T^\circ$  of 85°C and a  $\Delta\Delta G^\circ_U(37^\circ\text{C})$  of 2.26 kcal/mol as been determined (Table 1).

Similarly, one can see on Figure 7b and d that the intermediate state of Max\*VL/CG is more stable at pH 3.8 as depicted by the population of the I state in the vicinity of 0.8 at pH 3.8 (Figure 7b) compared to 0.6 at pH 6.8 (Figure 7d). Again here, the stability of the LZ domain is increased at lower pH (Figure 3d) with an increase of 5°C in  $T^\circ$  and a corresponding  $\Delta\Delta G^\circ_U(37^\circ\text{C})$  of 1.73 kcal/mol (Table 2). Interestingly the first transition ascribed to the unfolding of the HLH has a higher  $T^\circ$  and a  $\Delta\Delta G^\circ_U(37^\circ\text{C})$  of 1.10 kcal/mol at pH 3.8 (Table 2). This could be caused by the stabilization of the HLH directly or through a cooperative effect of stabilizing the LZ domain as discussed below. As can be anticipated and as discussed above, removing the C-terminal disulfide bond decreases the  $T^\circ$  of the conformational transition of Max\*VL. Indeed, at the same concentration in dimer units (32  $\mu\text{M}$ ) and pH6.8, the  $\Delta T^\circ$  between the denaturation of the LZ domains of Max\*VL and Max\*VL/CG is 15°C (Table 1 and 2).

The N state of Max\* at pH 3.8 transforms into a stable I state with a  $T^\circ$  of 35°C (Figure 6a). As discussed above, the I state has its LZ domain unfolded (see Figure 4b) with a maximum population close to 90% at 45°C. One can also see that the transition of the I state into the U state has a  $T^\circ$  of 60°C. Although the temperature denaturation recorded for Max\* at pH 6.8 appears to be two-state, it could not be fitted with a two-state model. Satisfactory fits could only be obtained when an intermediate state was included in the fitting procedure. Contrary to the other cases where two transitions could be clearly

observed, it is difficult to assess which domain unfolds first or in other words, what is the intermediate state. The best fits were obtained when the same intermediate state as the one observed at pH 3.8 was assumed (Figure 4b). The  $T^\circ$  for the transition involving the denaturation of the LZ obtained was 49.6°C and the one obtained for the denaturation of the HLH was 51.1°C (Table 1). One can see on Figure 6c the coexistence of all three states of Max\* around 50°C and pH 6.8. Therefore, one can appreciate the destabilizing effect of increasing the population of protonated His **81d** at the interface of the LZ at pH 3.8 by comparing the differences in  $T^\circ$  of the first transitions in figures 3a. Indeed, the  $T^\circ$  has been decreased from 50°C to 35°C with a corresponding  $\Delta\Delta G^\circ_U(37^\circ\text{C})$  of 2.93 kcal/mol by decreasing the pH from 6.8 to 3.8 (Table1). Conversely, only the N state of Max\*VL can be observed at pH 8 and 50°C (Figure 6d). Finally, the proposed role of Asn **78a** and His **81d** in the destabilization of Max<sup>(19,21,22)</sup> can be fully appreciated from the fact that at pH 6.8 there is an increase in  $T^\circ$  for the unfolding LZ from 49.6°C to 80.7°C by the N78V/H81L double mutation with a corresponding  $\Delta\Delta G^\circ_U(37^\circ\text{C})$  of 9.2 kcal/mol (Table1).

Interestingly, the mutation in the LZ has increased the  $\Delta G^\circ_U$  of the HLH of Max\*VL compared to Max\* at pH 6.8. Indeed the  $\Delta G^\circ_U$  of the HLH of Max\* and Max\*VL at 37°C are 1.5 and 3.8 kcal/mol respectively (Table 1). This is most likely caused by a cooperative effect that can be explained as follows. Increasing the  $\Delta G^\circ_U$  of the LZ and the probability of finding it in the folded state at 37°C will increase the probability of finding the HLH domain in a proper configuration for folding thereby increasing the rate of folding of the HLH domain in Max\*VL leading to a larger  $\Delta G^\circ_U$  as observed. The

increase in the stability of the LZ and the HLH in Max\*VL should increased, as aimed, the stability of the complex with E-Box sequences. In the same way, it is important to note that Max\*VL/CG is more stable than Max\*. Indeed, at a concentration of 32  $\mu$ M (in dimer units), the population of the unfolded state of Max\* almost 100% at 60°C (Figure 6c) while that of Max\*VL/CG is only approximately 20% at 60°C (Figure 7d). Therefore, it is clear that the mutation, at this concentration, provides more stabilization than the disulfide bond and should also lead to a more stable complex with DNA.

The temperature denaturations curves of Max\*/CG shown on Figure 5a depict apparent  $T^\circ$  of 33°C, 37°C and 42°C for concentrations of 10  $\mu$ M, 64  $\mu$ M and 450  $\mu$ M respectively. By increasing the concentrations, the population of homodimers, is increased as observed by the increasing  $T^\circ$  (Figure 5c). What is important to point out is that the molar ellipticity at 5°C never reaches the one observed for Max\*. From the fitting of the temperature denaturation (Figure 3c) and assuming a two-state transition for Max\*/CG, we have determined a  $K_D$  of  $104 \cdot 10^{-6}$  at 37°C and pH 6.8 (Table 2). It has to be noted that the three-state model was not adequate to simulate the temperature denaturations of none of the concentrations, suggesting that indeed no stable intermediate was significantly populated. The observed  $K_D$  at 37°C is somewhat higher than the ones reported elsewhere <sup>(27,31)</sup>. On the other hand, it has to be reminded that the ionic strength at which our  $K_D$  value has been determined is higher. This is suggestive of the screening of favorable electrostatic interactions contributing to the stabilization of the Max b-HLH-LZ. Indeed inter-helical salt-bridges are predicted to occur at the interface of the LZ and HLH domains <sup>(18,19)</sup>. Even with such a high  $K_D$ , the population of dimer should be

optimal at concentrations of 450  $\mu$ M. But even at such a high protein concentration, the helical content does not reach that of the Max\*, Max\*VL and Max\*VL/CG. This suggests that the dimer of Max\*/CG is not fully helical. In addition, one can see on Figure 6a and c, that the population of the native state of Max\*/CG never reaches 100% at room temperature and above at both pH 3.8 and 6.8. So it appears that Max\*/CG does not exist as a 100% dimeric state even at room temperature. This should lead to a weaker DNA complex than Max\*, Max\*VL and Max\*VL/CG.

Finally, it is important to observe that the  $K_D$  (37°C) obtained from the temperature denaturation of Max\*VL/CG (*i.e.* the second transition on Figure 4d) at pH 3.8 and 6.8 are  $1.02 \cdot 10^{-10}$  and  $1.68 \cdot 10^{-9}$  respectively (Table 1). It is evident that the stabilization of the LZ domain of Max\*VL/CG reflects on the  $K_D$ . Compared to the corresponding  $K_D$ (37°C) of  $1.81 \cdot 10^{-4}$  and  $1.04 \cdot 10^{-4}$  for Max\*/CG (Table 2), one can appreciate the improvement of the stability provided by the N78V/H81L double mutation. In the light of our goal, which is to stabilize the b-HLH-LZ, it is therefore expected that the E-Box:Max\*VL/CG complex will be more stable than the E-Box:Max\*/CG. In addition, due to the cross-link and the resulting entropic advantage discussed above, it is also to be expected that at the same concentration that the E-Box:Max\*VL, will be more stable than the E-Box:Max\* complex.

### ***DNA binding***

We show on Figure 8a and b the far-UV CD spectra of 1:1 mixtures of E-Box:Max\* and E-Box:Max\*VL at 20°C. As one can observe, the helical content is increased in the presence of DNA, a result previously reported and indicating the folding of the basic region when it is interacting with the E-Box<sup>(31)</sup>. The helical contents of both Max\* and Max\*VL in complex with the E-Box sequence are again virtually identical (75%). The 25 % of non-helical content corresponds well also to the loop region and some amino acids on the N and C termini. This indicates that the population of Max\* and Max\*VL DNA complexes is similar at 20°C. On Figure 8c and d, we show the CD spectra of the 1:1 mixtures of E-Box:Max\*/CG and E-Box:Max\*VL/CG at 20°C. One can see that the molar ellipticity of E-Box:Max\*VL/CG is virtually identical to those of E-Box:Max\* and E-Box:Max\*VL. This indicates that the secondary and tertiary structures of the bound Max\*VL/CG is virtually identical to Max\* and Max\*VL. On the other hand, the helical content of the E-Box:Max\*/CG complex is lower by 14 %. This could indicate a lower population of complex that could be caused by a decrease in affinity for DNA of Max\*/CG. We have observed that increasing the concentration of DNA does not increase the molar ellipticity (data not shown). Therefore, the amount of complex is optimal. This strongly suggests that the missing helical content comes for the partial unfolding of the LZ domain for Max\*/CG.

We present on Figure 9a, the temperature induced denaturations of E-Box:Max\* and E-Box:Max\*VL complexes monitored by CD. The E-Box:Max\* complex temperature denaturation curve is again reminiscent of a two-state transition. This suggests that DNA dissociation, unfolding of the basic region, unfolding of the LZ and the HLH domains are

again superimposed over a small range of temperature. The presence of DNA increased the apparent  $T^{\circ}$  from 51°C to 59°C for the Max\*, indicating the stabilization of at least the b-HLH of Max\* as expected from law of mass action. For E-Box:Max\*VL, again, we observe two transitions. The first transition is accompanied by a 50% loss in helical content. This corresponds to the helical content that would be lost for the denaturation of the basic region and the HLH. This strongly suggests that the E-Box:Max\*VL complex is disrupted during this transition. It has to be reminded that the contribution of DNA to the CD signal at 222nm has been removed. Moreover the apparent  $T^{\circ}$  of the E-Box is 78°C (see insert of Figure 9a). This demonstrates that the melting of DNA is not contributing significantly to the first transition (apparent  $T^{\circ}$  = 66°C) and that the loss in CD signal comes from the denaturation of E-Box:Max\*VL interactions. In addition, the second transition is exactly superimposable on the second transition observed for Max\*VL (without DNA) at pH 6.8 that is ascribed to the unfolding of the LZ and part of H2 (Figure 3b). This indicates furthermore that there is virtually no population of DNA complex left after the first transition. DNA increased the melting point of the first transition from 60°C to 66°C again validating that the DNA stabilizes the basic region and HLH domains. Although we can not directly compare the transitions that are describing the dissociation and disruption of the DNA complexes due to the superimposition of transitions in the case of the E-Box:Max\* complex as described above, it is clear that the E-Box:Max\*VL complex is more stable. Indeed, one can clearly see on Figure 9a that at 60°C the population of E-Box:Max\* complex is close zero while the population of E-Box:MaxVL\* is still close to maximum.

The temperature denaturation of the E-Box:Max\*/CG and E-Box:Max\*VL/CG complexes are shown in Figure 9b. In both cases the denaturation appears two-state. Again this is likely due to a superposition of transitions as discussed above. Interestingly, at the protein concentration used in this study, the gain in apparent stability of the DNA complexes provided by the double mutation is more important for the non-disulfide variants than for the disulfide linked ones. Indeed, the increase in  $T^\circ$  between E-Box:Max\*/CG and E-Box:Max\*VL/CG is approximately 15°C while the corresponding  $\Delta T^\circ$  for the E-Box:cross-linked variants complexes is approximately 17°C. This translates into a significant stabilization of the E-Box:Max b-HLH-LZ complex at physiological temperature. Indeed, we can see that at 37°C, the amount of E-Box:Max\*/CG complex is less than 100%, while that of E-Box:Max\*VL/CG is still maximal even above 55°C. As expected, for the same concentration of dimer, the apparent  $T^\circ$  of the non-disulfide bonded variants are lower than those of their cross-linked counterparts. Indeed the corresponding  $T^\circ$  are 59°C and 48°C, for the E-Box:Max\* and E-Box:Max\*/CG complexes respectively and 77°C and 63°C between the E-Box:Max\*VL (first transition in Figure 9a) and E-Box:Max\*VL/CG complexes respectively. The effect of the cross-link is less important in the latter case.

Finally, it is important to point out that at the same concentration (32  $\mu$ M of dimer), the N78V/H81L double mutation provides more stabilization to the E-Box:Max b-HLH-LZ complex than a cross-link (in the form of a disulfide bond) at the C-terminus of the protein. Indeed, as shown on Figure 9a, the apparent  $T^\circ$  of the E-Box:Max\* complex is 59°C and the apparent  $T^\circ$  of the E-Box:Max\*VL/CG complex is 63°C.



## ***Conclusion***

It has been reported that overexpressing the Max protein in cells can reduce the c-Myc activated transcription <sup>(26)</sup>. This effect is thought to come from blocking the access of c-Myc to the promoters of target genes by the specific binding of Max homodimers to the E-Box sequences recognized by c-Myc. The main objective of our study was the design of Max b-HLH-LZ variants with improved thermodynamic stability as homodimers that would form more stable E-Box complexes and improved this anti-c-Myc activity. We have shown that the N78V/H81L double mutant was a successful design in that regard. Both the cross-linked (Max\*VL) and non-cross-linked (Max\*VL/CG) variants form more stable homodimers than their native counterparts. Accordingly, the E-Box:Max\*VL and the E-Box:Max\*VL/CG complexes are significantly more stable than the wild-type counter-parts. We also observe that the disulfide-bond additionally engineered also stabilized the Max b-HLH-LZ and the E-Box complexes. Such a cross-linking approach *in vivo* would not necessarily be practical as it would depend on the redox-potential of the nucleus, or in other words if the disulfide bond is made. On the other hand, we observe that the gain in stability of Max\*VL/CG is more important than cross-linking Max\* at 32  $\mu$ M of dimer units. In other words, at this concentration the double mutation provides more stability to Max b-HLH-LZ than cross-linking it. At 37°C and pH 6.8, we report a  $10^5$  fold decrease for the  $K_D$  of the Max b-HLH-LZ provided by the double mutation. This clearly emphasizes the aptness of our design and the potential applicability in a gene

therapy-like approach where Max bearing the mutation could be express without necessitating any post-translational modifications to form a highly stable DNA complex or bind DNA at much lower concentrations and therefore reduce more effectively the c-Myc activated transcriptional activity than the wild-type Max. One additional advantage of our design to reduce residues in the fact that critical residues (Asn **78a** and His **81d**) for molecular recognition of c-Myc have been removed from Max. This should in theory prevent heterodimerization of Max variants bearing the double mutation with endogenous c-Myc. We are in the process of verifying this assertion experimentally. We are currently testing the relative ability of Max\*/CG, Max\*VL/CG, the complete gene product of Max bearing the N78V/H81L double mutation to repress the transcription of c-Myc target genes in EcR-293 cells.

Finally, we show that the HLH and LZ domains of Max can unfold independently. This leads to the existence of intermediates states. We have developed and presented a formalism for fitting the temperature denaturation curves that takes into account the existence of a intermediate state.

### *Acknowledgements*

This research was funded from grants form Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). FG is the recipient of an NSERC postgraduate scholarship. PL acknowledges the Fonds de

recherche sur la nature et les technologies du Québec for a scholarship. We are grateful to Dr. Klaus Klarskov for the mass spectra and Ms Susan Henry for her help.

### *Materials and Methods*

#### Construction of pET3a expression plasmids encoding Max\* and Max\*VL

To obtain Max\* (Figure 1), a polymerase reaction was performed using pVZ1 p21 max (kindly provided by R.N. Eisenman, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington) as template and oligonucleotides 5'-d(CCGCCATATGGCTGACAAACGGGCTCAT)-3' and 5'-d(GGCGGGATCCCTCCAGTGCACGGACTTG)-3' as 5' and 3' primers respectively. The 5' and 3' primers contained *Nde*I and *Bam*HI restriction sites respectively. The plasmid pET3a (Novagen) and PCR product were digested with the corresponding restriction enzymes before purification on agarose gel using QIAquick gel extraction Kit (Quiagen) and ligation.

The construct encoding Max\*VL (Figure 1) was obtained by direct site mutagenesis. The mutations were obtained using 3 different PCR reactions. All reactions were performed using 25 pmol of oligonucleotides in Ready-to-Go PCR beads (Pharmacia). The 5' fragment was generated using oligonucleotides 5'-d(CCGCCATATGGCTGACAAACGGGCTCAT)-3' and 5'-d(CTTGCTGGAGTGTGTGGACTTTCC)-3' as 5' and 3' primers in a PCR reaction.

The 3' primer contained nucleotide substitutions introducing a valine at position 5 (**V78**) and leucine at position 8 (**L81**) of the leucine zipper region. The 3' fragment was generated by PCR using oligonucleotides 5'-d(GGAAAGTCCACACACTCCAGCAAG)-3' and 5'-d(GGCGGGATCCCTCCAGTGCACGGACTTG)-3' as 5' and 3' primer respectively. The 5' primer corresponded to the complement of the 3' oligonucleotide used in the generation of the 5' fragment. The complete Max\*VL was produced by PCR using the same oligonucleotide as Max\* with the 5' fragment and 3' fragment as templates. The PCR product was digested with *NdeI* and *BamHI* and purified before ligation in pET3a.

The mutation C87G was introduced using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Statagene). Two complementary oligonucleotides 5'-d(GGATCCGGCGGGCTAACAAAGCCCGAAAG)-3' containing the desired mutation (underlined), flanked by unmodified nucleotide sequence were designed and obtained from Invitrogen. Mutation was introduced by PCR reaction on the plasmid containing Max\* and Max\*VL respectively. The PCR reaction was followed by a digestion with *Dpn I* in order to digest the methylated, nonmutated parental plasmid. Then, the circular, nicked dsDNA was transformed into XL10 competent cells that repair the nicks in the mutated plasmid.

### *Protein Expression and Purification*

The b-HLH-LZ of Max WT and mutant (Max\*, Max\*VL, Max\*/CG and Max\*VL/CG) were prepared by induction of a pET construct in *Escherichia coli* by with IPTG. The total protein extracts were then purified by cation exchange chromatography to produce highly pure and soluble recombinant proteins as described <sup>(18)</sup>. Determination of MW by mass spectroscopy revealed 20,116.0 and 20,038.0 for Max\* and Max\*VL values identical to the theoretical MW of the constructs including a Gly-Ser-Gly-Cys tail at the C-terminal. The mutations were also confirmed by DNA sequencing of the two plasmids used for the induction in prokaryotes. Determination of MW by mass spectroscopy of Max\*/CG and Max\*VL/CG revealed 10,302.4 and 10,249.5 respectively indicating that the cystein 87 was mutated to a glycine. The mutation was also confirmed by DNA sequencing.

The expression pET3a plasmids were transformed into *E. coli* strain BL21 (DE3) pLysS, plated on LB-agar containing chloramphenicol (CAM) and ampicilin, and grown at 37°C overnight. A colony was picked and cultured in 5 ml LB with CAM and ampicilin to obtain an O.D.<sub>600 nm</sub> of 0.6. The culture was then diluted in a 0.5 l of same buffer and grown at 37°C until O.D.<sub>600 nm</sub> reaches 0.6 again. The expression of proteins was induced for a period of 3 hours by adding isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) to a final concentration of 0,6 mM. After induction, cells were harvested by centrifugation and the pellet was mixed in 2 ml of a resuspension buffer (50 mM tris-HCl pH 7.4, 10.0 mM, 0.1% Nonidet P40 detergent, 0.1 M NaCl). Using sonication, the cells were lysed and 0.3 ml of bovine pancreatic DNase I was added for 30 minutes at 25°C. Then 0.25 ml of polyethylene imide (PEI) 5% was added in order to precipitate negatively charged

proteins, DNA and RNA. The samples were centrifuged again and the supernatant was collected and applied on a HiPrep™ 16/10 SP XL (Pharmacia), a cation exchange column. The Max protein was eluted with a linear gradient of NaCl (0-2.0 M) in 50 mM acetate buffer at pH 5.0. The fractions containing the Max protein were collected, dialyzed overnight, and then lyophilized. The proteins were resuspended in its respective buffer for CD and fluorescence analysis at pH 7.5 and let to air oxidize overnight. Completion of the oxidation was confirmed by Mass spectrometry. Protein concentrations were obtained by quantitative amino acid analysis.

### *Circular Dichroism*

Circular dichroism measurements were performed on a Jasco J-810 spectropolarimeter equipped with a Jasco Peltier thermostat type. The instrument was routinely calibrated with an aqueous solution of *d*-10-(+)-camphor-sulfonic acid at 290.5 nm. The samples were loaded in quartz cells with a path length of 1.0 mm. Wavelength spectra were recorded at 20°C from 195 to 350 nm by averaging 5 scans at 0.1 nm intervals. The values are shown in mean residue molar ellipticity (mdeg·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>). Samples of proteins were diluted to a concentration of 32 μM in 100 mM phosphate pH 6.8, 100 mM KCl buffer for Max\* and Max\*VL and diluted to 64 μM (32 μM in dimer unit) in the same buffer for Max\*/CG and Max\*VL/CG. The temperature dependent denaturation scans were performed in the temperature range from 5 to 95°C with a rate of heating of 1°C/min. The unfolding was recording at a wavelength of 222 nm. For DNA studies, the dsDNA was created by heating oligonucleotides containing E-Box sequence (underlined)

5'-d(CCCCCAACACGTGT T G C C T G A ) - 3'                      a n d                      5' -  
d(TCAGGCAACACGTGTTGGGGG)-3' at 95°C and cooling the solution slowly to  
room temperature. To determine the melting temperature of dsDNA, denaturation was  
followed at 222 nm in the temperature range from 5 to 95°C with a rate of heating of  
1°C/min in phosphate buffer (100 mM phosphate pH 6.8, 100 mM KCl). The  
concentration of dsDNA was 32  $\mu$ M in dimer unit. For DNA binding studies, wavelength  
scans at 20°C and thermal denaturations at 222 nm were performed by adding the dsDNA  
to the protein homodimers solution to obtain equal molar concentrations. The DNA  
contribution at 222 nm in all denaturation studies was subtracted with the dsDNA  
denaturation curve. For pH dependant studies, the phosphate buffer was adjusted to a pH  
value of 3.8 but with same concentrations of salts.

### ***Simulation of the temperature-induced denaturation curves***

In order to simulate the temperature denaturation curves assuming the existence of an  
intermediate state, the thermodynamic parameters:  $T^\circ$ ,  $\Delta H^\circ_U(T^\circ)$  and  $\Delta C_{p,U}$  for the  
unfolding transitions between the native (N) and the intermediate (I) states as well as  
between the I and unfolded (U) states have to be fitted in order to obtain the two  
corresponding  $\Delta G^\circ_U(T)$  and equilibrium constants at all temperatures. Once these  
equilibrium constants are evaluated, the populations of the three states  $P_N(T)$ ,  $P_I(T)$  and  
 $P_U(T)$  can be calculated and the temperature denaturation curves ( $[\Theta]_{222}$  vs T) simulated  
using equation 1:

$$[\Theta](T) = P_N(T) \cdot [\Theta]_N(T) + P_I(T) \cdot [\Theta]_I(T) + P_U(T) \cdot [\Theta]_U(T) \quad (1)$$

where  $[\Theta]_N(T)$ ,  $[\Theta]_I(T)$  and  $[\Theta]_U(T)$  are the temperature dependent mean molar residue ellipticity at 222 nm of the N, I and U states respectively. All of them were assumed to be linear. In other words,  $[\Theta]_N(T) = [\Theta]_N(0) - d[\Theta]_N(T)/dT \cdot T$ ;  $[\Theta]_I(T) = [\Theta]_I(0) - d[\Theta]_I(T)/dT \cdot T$  and  $[\Theta]_U(T) = [\Theta]_U(0) - d[\Theta]_U(T)/dT \cdot T$ , where  $[\Theta]_N(0)$ ,  $[\Theta]_I(0)$  and  $[\Theta]_U(0)$  are the mean residue ellipticities at 222 nm at 0°C for the N, I and U states respectively and  $d[\Theta]_N(T)/dT$ ,  $d[\Theta]_I(T)/dT$  and  $d[\Theta]_U(T)/dT$  are the constant slopes. In order to limit the degrees of freedom and add consistency between the parameters to fit, we have expressed  $[\Theta]_I(0)$  in terms of  $[\Theta]_N(0)$ ,  $[\Theta]_U(0)$  and  $F_I$ , the total loss of  $\alpha$ -helical content upon denaturation of N into I:

$$[\Theta]_I(0) = [\Theta]_N(0) + F_I \cdot ([\Theta]_U(0) - [\Theta]_N(0)) \quad (2)$$

When the first transition involved the denaturation of the LZ, values of  $F_I$  around 66% were obtained. This value of  $F_I$  corresponds closely to the overall  $\alpha$ -helical content of the LZ domain and part of H2. On the other hand, when the first transition involved the denaturation of the HLH, a  $F_I$  value of 20% was used. This corresponds well to the overall  $\alpha$ -helical content of H1 and part of H2.

For the cross-linked dimers,  $P_N(T)$ ,  $P_I(T)$  and  $P_U(T)$ , the populations of the N, I and U states respectively are given by:



$$P_N(T) = \frac{1}{1 + K_I(T) + K_I(T) \cdot K_U(T)} \quad (3)$$

$$P_I(T) = \frac{K_I(T)}{1 + K_I(T) + K_I(T) \cdot K_U(T)} \quad (4)$$

$$P_U(T) = \frac{K_U(T) \cdot K_I(T)}{1 + K_I(T) + K_I(T) \cdot K_U(T)} \quad (5)$$

where  $K_I$  is the equilibrium constant of the transition between the native and the intermediate state and  $K_U$  is equilibrium constant of the transition between the intermediate and the unfolded state (Figure 4a). Each of them is expressed in terms of the standard Gibbs free energy:

$$K_I(T) = \exp(-\Delta G_I^\circ / RT) \quad (6)$$

$$K_U(T) = \exp(-\Delta G_U^\circ / RT) \quad (7)$$

The temperature dependence of the standard Gibbs free energies of unfolding for the two transitions ( $\Delta G_I^\circ(T)$  and  $\Delta G_U^\circ(T)$ ) are given by:

$$\Delta G_I^\circ(T) = \Delta H_I^\circ(T_I^\circ) - T \cdot \frac{\Delta H_I^\circ(T_I^\circ)}{T_I^\circ} + \Delta C_{pl} \cdot ((T - T_I^\circ) - \ln(\frac{T}{T_I^\circ})) \quad (8)$$

$$\Delta G_U^o(T) = \Delta H_U^o(T_U^o) - T \cdot \frac{\Delta H_U^o(T_U^o)}{T_U^o} + \Delta C_{pU} \cdot ((T - T_U^o) - \ln(\frac{T}{T_U^o})) \quad (9)$$

where  $T_I^o$  and  $T_U^o$  are the melting temperatures (*i.e.* where  $\Delta G_I^o=0$  and  $\Delta G_U^o=0$ ),  $\Delta H_I^o(T_I^o)$  and  $\Delta H_U^o(T_U^o)$  are the standard van't Hoff enthalpies of unfolding at  $T_I^o$  and  $T_U^o$ .  $\Delta C_{p,I}$  and  $\Delta C_{p,U}$  are the heat capacities of unfolding for the two transitions. Although  $\Delta C_p$  is reported to depend on the temperature<sup>(33,34)</sup>, we have considered the  $\Delta C_p$  temperature independent. This is a good approximation up to 85°C<sup>(33,34)</sup>.  $\Delta C_p$  was taken to be equal to 0.4 kcal·mol<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup> for the unfolding of the HLH and equal to 0.6 kcal·mol<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup> for the unfolding of the LZ. These values are representative values for domains of these sizes.  $\Delta C_p$  was observed to be the least sensitive parameter. Variations up to 30% did not affect significantly the more sensitive parameters  $\Delta H_U^o(T^o)$  and  $T^o$  and consequently did not impact on  $\Delta G_U^o(T)$  and ultimately on  $P(T)$ .

For Max\*VL/GC, the thermodynamic parameters describing the transitions between the N and the I states as well as between the I and U were also obtained from the fitting of the temperature denaturation curves ( $[\Theta]_{222}$  vs  $T$ ) using a three-state unfolding formalism.  $P_N(T)$  and  $\Delta G_I^o(T)$  are given again by equations 3 and 8. In this case, the dissociation of the two monomers has to be accounted for. Indeed, the second transition does not only consider the unfolding of the LZ and part of H2, but also its dissociation ( $K_D$  in Figure 4d). Now, the monomer concentration becomes a new parameter in the  $\Delta G_U^o(T)$  and  $P_U(T)$  functions as seen in equations 10 and 11:

$$P_U(T) = \frac{-K_D(T) + \sqrt{K_D(T)^2 + 8 \cdot pT \cdot K_D(T)}}{4pT} \quad (10)$$

$$\Delta G_U^o(T) = \Delta H_U^o(T_U^o) - T \cdot \left( \frac{\Delta H_U^o(T_U^o)}{T_U^o} + R \cdot \ln(1.66pT) \right) + \Delta C_{pU} \cdot ((T - T_U^o) - \ln(\frac{T}{T_U^o})) \quad (11)$$

where  $pT$  is the total concentration of protein in monomer units<sup>(34)</sup>.  $\Delta C_{p,I}$  and  $\Delta C_{p,U}$ , the temperature-independent heat capacity of unfolding for the two transitions, were kept the same as those used for the cross-linked species.  $P_I(T)$ , the population of the intermediate state, is simply given by  $(1 - P_N(T) - P_U(T))$ . A  $F_I$  value of 20% was used.

In the case of Max\*/GC, the thermodynamic parameters were fitted to the thermal denaturation curves ( $[\Theta]_{222}$  vs  $T$ ) with a simple two-state unfolding formalism using equation 12:

$$[\Theta](T) = (1 - P_U(T)) \cdot [\Theta]_N(T) + P_U(T) \cdot [\Theta]_U(T) \quad (12)$$

where  $[\Theta]_N(T)$  and  $[\Theta]_U(T)$  are the temperature dependent mean molar residue ellipticity at 222 nm of the native and unfolded states respectively as explained above.  $P_U(T)$ , the population of the unfolded state is given by equation 10.  $P_N(T)$  is given here by  $(1 - P_U(T))$ . The temperature dependence of the standard Gibbs free energy of unfolding ( $\Delta G_U^o(T)$ ) is given by equation 11.  $\Delta C_{pU}$ , the temperature-independent heat capacity of

unfolding of the complete protein complex, was considered to be the sum of the temperature-independent heat capacities of unfolding for the two transitions used in the other protein species, which gives a total values of  $1.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ .  $K_D(T)$  values are given by equation 7, using the equation 11 for  $\Delta G^\circ_U(T)$ .

### ***Molecular modeling***

All the molecular modeling was done using the InsightII suite (Acceleris) running on an Octane SGI workstation. The protein and DNA coordinates of Myn:E-Box complex (murine Max) were used (PDB accession number: 1AN2.pdb). Unfolding of the different domains was accomplished through molecular dynamics simulations having the domains to be unfolded unrestrained and the domains to be folded restrained at high temperatures. The molecular rendering has been done using the program Ribbons<sup>(37)</sup>.

### **Reference**

1. Amati, B., and Land, H. (1994). Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev* **4**(1), 102-8.
2. Henriksson, M., and Luscher, B. (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* **68**, 109-82.

3. Bouchard, C., Staller, P., and Eilers, M. (1998). Control of cell proliferation by Myc. *Trends Cell Biol* **8**(5), 202-6.
4. Facchini, L. M., and Penn, L. Z. (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *Faseb J* **12**(9), 633-51.
5. Blackwood, E. M., and Eisenman, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* **251**(4998), 1211-7.
6. Blackwood, E. M., Luscher, B., Kretzner, L., and Eisenman, R. N. (1991). The Myc:Max protein complex and cell growth regulation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **56**, 109-17.
7. Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., and Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 653-99.
8. McMahon, S. B., Wood, M. A., and Cole, M. D. (2000). The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol* **20**(2), 556-62.
9. Luscher, B. (2001). Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. *Gene* **277**(1-2), 1-14.
10. Vassilev, A., Yamauchi, J., Kotani, T., Prives, C., Avantaggiati, M. L., Qin, J., and Nakatani, Y. (1998). The 400 kDa subunit of the PCAF histone acetylase complex belongs to the ATM superfamily. *Mol Cell* **2**(6), 869-75.

11. Grant, P. A., Schieltz, D., Pray-Grant, M. G., Yates, J. R., 3rd, and Workman, J. L. (1998). The ATM-related cofactor Tral is a component of the purified SAGA complex. *Mol Cell* **2**(6), 863-7.
12. Ikura, T., Ogryzko, V. V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., and Nakatani, Y. (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* **102**(4), 463-73.
13. Ayer, D. E., Kretzner, L., and Eisenman, R. N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* **72**(2), 211-22.
14. Zervos, A. S., Faccio, L., Gatto, J. P., Kyriakis, J. M., and Brent, R. (1995). Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(23), 10531-4.
15. Hurlin, P. J., Foley, K. P., Ayer, D. E., Eisenman, R. N., Hanahan, D., and Arbeit, J. M. (1995). Regulation of Myc and Mad during epidermal differentiation and HPV- associated tumorigenesis. *Oncogene* **11**(12), 2487-501.
16. Hurlin, P. J., Queva, C., and Eisenman, R. N. (1997). Mnt: a novel Max-interacting protein and Myc antagonist. *Curr Top Microbiol Immunol* **224**, 115-21.
17. Blackwood, E. M., and Eisenman, R. N. (1992). Regulation of Myc: Max complex formation and its potential role in cell proliferation. *Tohoku J Exp Med* **168**(2), 195-202.
18. Ferre-D'Amare, A. R., Prendergast, G. C., Ziff, E. B., and Burley, S. K. (1993). Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* **363**(6424), 38-45.

19. Lavigne, P., Kondejewski, L. H., Houston, M. E., Jr., Sonnichsen, F. D., Lix, B., Skyes, B. D., Hodges, R. S., and Kay, C. M. (1995). Preferential heterodimeric parallel coiled-coil formation by synthetic Max and c-Myc leucine zippers: a description of putative electrostatic interactions responsible for the specificity of heterodimerization. *J Mol Biol* **254**(3), 505-20.
20. Muhle-Goll, C., Nilges, M., and Pastore, A. (1995). The leucine zippers of the HLH-LZ proteins Max and c-Myc preferentially form heterodimers. *Biochemistry* **34**(41), 13554-64.
21. Lavigne, P., Crump, M. P., Gagne, S. M., Hodges, R. S., Kay, C. M., and Sykes, B. D. (1998). Insights into the mechanism of heterodimerization from the 1H-NMR solution structure of the c-Myc-Max heterodimeric leucine zipper. *J Mol Biol* **281**(1), 165-81.
22. Tchan, M. C., and Weiss, A. S. (2001). Asn<sup>78</sup> and His<sup>81</sup> form a destabilizing locus within the Max HLH-LZ homodimer. *FEBS Letters* **509**(2), 177-80.
23. Clark, A. R., and Docherty, K. (1993). Negative regulation of transcription in eukaryotes. *Biochem J* **296**(Pt 3), 521-41.
24. Kim, J. B., and Spiegelman, B. M. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* **10**(9), 1096-107.
25. Krylov, D., Kasai, K., Echlin, D. R., Taparowsky, E. J., Arnheiter, H., and Vinson, C. (1997). A general method to design dominant negatives to B-HLHZip proteins that abolish DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(23), 12274-79.

26. Koskinen, P. J., Vastrik, I., Makela, T. P., Eisenman, R. N., and Alitalo, K. (1994). Max activity is affected by phosphorylation at two NH<sub>2</sub>-terminal sites. *Cell Growth Differ* **5**(3), 313-20.
27. Fieber, W., Schneider, M. L., Matt, T., Krautler, B., Konrat, R., and Bister, K. (2001). Structure, function, and dynamics of the dimerization and DNA-binding domain of oncogenic transcription factor v-Myc. *J Mol Biol* **307**(5), 1395-410.
28. Wagschal, K., Tripet, B., Lavigne, P., Mant, C., and Hodges, R. S. (1999). The role of position a in determining the stability and oligomerization state of alpha-helical coiled coils: 20 amino acid stability coefficients in the hydrophobic core of proteins. *Protein Sci* **8**(11), 2312-29.
29. Cooper, T. M., and Woody, R. W. (1990). The effect of conformation on the CD of interacting helices: a theoretical study of tropomyosin. *Biopolymers* **30**(7-8), 657-76.
30. Chen, Y. H., Yang, J. T., and Chau, K. H. (1974). Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* **13**(16), 3350-9.
31. Horiuchi, M., Kurihara, Y., Katahira, M., Maeda, T., Saito, T., and Uesugi, S. (1997). Dimerization and DNA binding facilitate alpha-helix formation of Max in solution. *J Biochem (Tokyo)* **122**(4), 711-6.
32. Lavigne, P., Sonnichsen, F. D., Kay, C. M., and Hodges, R. S. (1996). Interhelical salt bridges, coiled-coil stability, and specificity of dimerization. *Science* **271**(5252), 1136-8.



33. Zhou, N. E., Zhu, B. Y., Kay, C. M., and Hodges, R. S. (1992). The two-stranded alpha-helical coiled-coil is an ideal model for studying protein stability and subunit interactions. *Biopolymers* **32**(4), 419-26.
34. Yu, Y. B., Lavigne, P., Kay, C. M., Hodges, R. S., and Privalov, P. L. (1999). Contribution of translational and rotational entropy of a dimeric coiled-coil. *J. Phys. Chem.* **103**, 2270-78.
35. Makhatadze, G. I., and Privalov, P. L. (1995). Energetics of protein structure. *Adv Protein Chem* **47**, 307-425.
36. Gomez, J., Hilser, V. J., Xie, D., and Freire, E. (1995). The heat capacity of proteins. *Proteins* **22**(4), 404-12.
37. Carson, M. (1987). Ribbon Models of Macromolecules. *J Mol Graph* **5**, 103-06.

## Figure legends

Figure 1. Max\*, Max\*VL, Max\*/CG and Max\*VL/CG recombinant proteins. (a) TOP. Schematic diagram of the complete sequence of human Max, Max\*, Max\*VL, Max\*/CG and Max\*VL/CG b-HLH-LZ constructions. Max\* and Max\*VL have a C-terminal Cys linker (GSGC). Max\*VL bears the double mutation. The C-terminal Cys was mutated for a Gly (GSGG) to obtain Max\*/CG and Max\*VL/CG. BOTTOM. The amino acid sequences of the Max\*, Max\*VL, Max\*/CG and Max\*VL/CG b-HLH-LZ (amino acids 21 to 103) showing the (N78V/H81L) double mutation in the Leucine Zipper and the mutation of the C-terminal Cys. The letters *a* to *g* under the Leucine Zipper sequence designate the position in the heptad repeat. The coiled-coil interface involves residues at positions *a*, *d*, *e* and *g* of one helix interacting with the positions *a*, *d*, *e* and *g* of the other  $\alpha$ -helix <sup>(21)</sup>. (b) Model of the Max b-HLH-LZ homodimer based on the crystal structure of Myn <sup>(18)</sup>. Are displayed, starting from the N-terminus, the unfolded Basic Region followed by the H1, the loop, the H2 (HLH), the Leucine Zipper and finally the C-terminal linker (GSGC or GSGG). The model was generated as described in Material and Methods and rendered with the program Ribbons <sup>(37)</sup>.

Figure 2. Far-UV CD spectra of Max\* (a), Max\*VL (b), Max\*/CG (c) and Max\*VL/CG at 20°C. Spectra are presented in mean residue ellipticity ( $[\Theta]$ ). All protein samples were

at a concentration of 32  $\mu$ M in dimer units and dissolved in a phosphate buffer (100 mM phosphate pH 6.8, 100 mM KCl).

Figure 3. Temperature induced denaturations of Max\* (a), Max\*VL (b), Max\*/CG (c) and Max\*VL/CG (d) at pH 3.8 (filled circles) and pH 6.8 (open circles). Unfolding was monitored by recording  $[\Theta]$  at 222nm as a function of temperature. All denaturations were found to be fully reversible. Protein samples were at a concentration of 32  $\mu$ M (dimer units) in a phosphate buffer (100 mM phosphate pH 6.8, 100 mM KCl). The continuous lines show the best fit of the data with equation 1 for Max\*, Max\*VL, and Max\*VL/CG and with equation 12 for Max\*/CG (see Materials and Methods). The best-fit parameters are listed in Table 1 and 2.

Figure 4. Max\*VL (a) and Max\* (b) are in equilibrium with an intermediate state. Models of the different states, equilibriums and equilibrium constants are shown. Fictitious dimer of Max\*VL and equilibriums as an explanation for the occurrence of two transitions on the temperature denaturation curves of Max\*VL (c). The existence of this aggregation state is ruled out by the observation of two transitions and the existence of a stable intermediate state (Figure 7b and d) in the denaturation of Max\*VL/CG (d). No stable intermediate state is significantly populated for the denaturation of Max\*/CG (e). In addition, the helical content of the Max\*/CG dimer is lower than all the other variants as described in the text. The models have been generated by molecular dynamics

simulations as described in Materials and Methods. The model were rendered with the program Ribbons<sup>(37)</sup>

Figure 5. Temperature-induced denaturations of Max\*/CG (a) and Max\*VL/CG (b) at multiple concentrations. First derivative of the temperature induced denaturations of Max\*/CG (c) and Max\*VL/CG (d). Concentrations (in monomer units) for Max\*/CG: 10  $\mu$ M (solid circle), 64  $\mu$ M (open square) and 450  $\mu$ M (open circles) and for Max\*VL/CG: 10  $\mu$ M (solid circle), 64  $\mu$ M (open square) and 400  $\mu$ M (open circles). Only the  $T^\circ$  of the second transition of Max\*VL/CG is concentration dependent as seen from the displacement towards higher temperatures of the second maximum only (d). Unfolding was monitored by recording  $[\Theta]$  at 222 nm as a function of temperature. All denaturations were found to be fully reversible. Protein solutions were in a phosphate buffer (100 mM phosphate pH 6.8, 100 mM KCl).

Figure 6. Populations of the native (solid circles), intermediate (open squares) and unfolded (open circles) states of Max\* at pH 3.8 (a), Max\* at pH 6.8 (b), Max\*VL at pH 3.8 (c) and Max\*VL at pH 6.8 (d). These populations have been obtained from the fitting of the temperature denaturation (Figure 3a and b) as explained in Materials and Methods. Refer to Figure 4 and text for the nature of the intermediate states.

Figure 7. Populations of the native (solid circles) and unfolded (open circles) states of Max\*/CG at pH 3.8 (a) and pH 6.8 (b). Populations of the native (solid circles), intermediate (open squares) and unfolded (open circles) states Max\*VL/CG at pH 3.8 (c)

and 6.8 (d). These populations have been obtained from the fitting of the temperature denaturation (Figure 3c and d) as explained in Materials and Methods. Refer to Figure 4 and text for the nature of the intermediate state for Max\*VL/CG.

Figure 8. Far-UV CD spectra of Max\* (a), Max\*VL (b), Max\*/CG (c) and Max\*VL/CG (d) with and without the E-Box dsDNA sequence at 20°C. The proteins and E-Box dsDNA are at a concentration of 32  $\mu$ M (dimer units) and dissolved in a phosphate buffer (100 mM phosphate pH 6.8, 100 mM KCl).

Figure 9. (a) Temperature-induced denaturation of E-Box:Max\* (solid circles) and E-Box:Max\*VL (open circles) complexes. (b) Temperature-induced denaturation of E-Box:Max\*/CG (solid circles) and E-Box:Max\*VL/CG (open circles) complexes. Insert, Temperature induced denaturation of E-Box dsDNA. Solvent conditions and concentrations are identical as in Figure 8. Data are presented in mean residue molar ellipticity  $[\Theta]$  at 222nm, except for insert in which the data is presented in mdeg.

Table 1. Thermodynamical parameters obtained from the simulations of the temperature-induced denaturation of Max\* and Max\*VL at pH 3.8 and 6.8.

Table 2. Thermodynamical parameters obtained from the simulations of the temperature-induced denaturation monitored of Max\*/CG and Max\*VL/CG at pH 3.8 and 6.8.

Figure 1

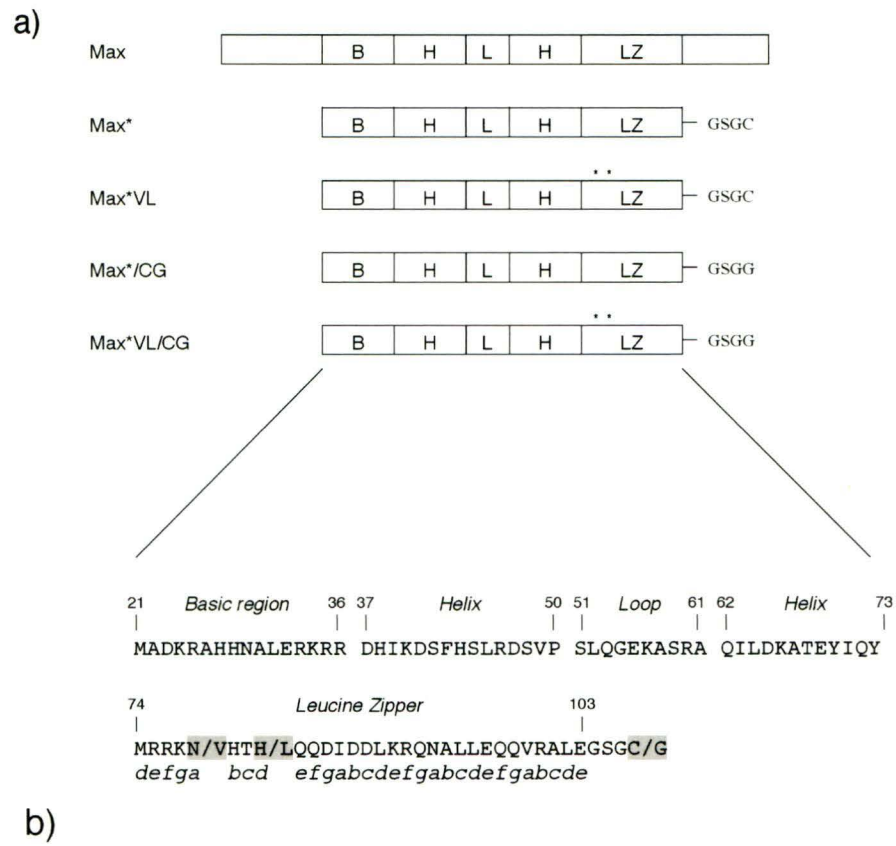


Figure 2

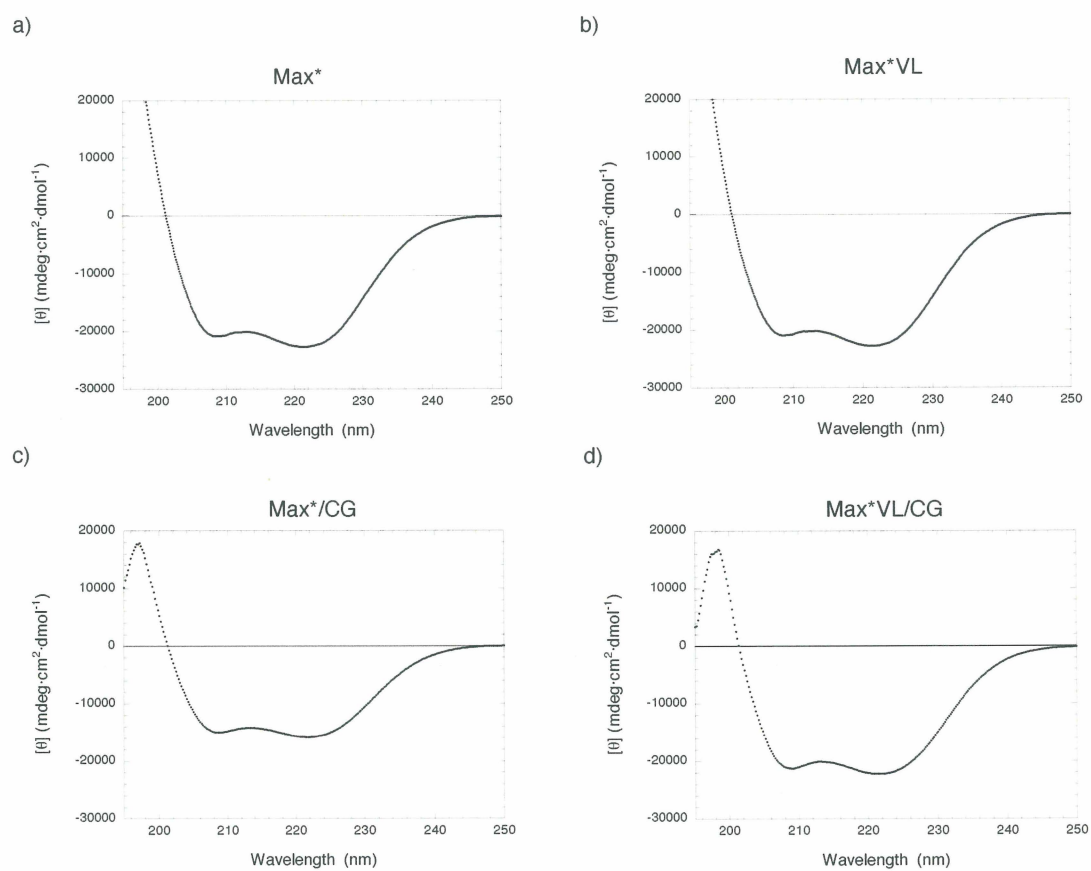


Figure 3

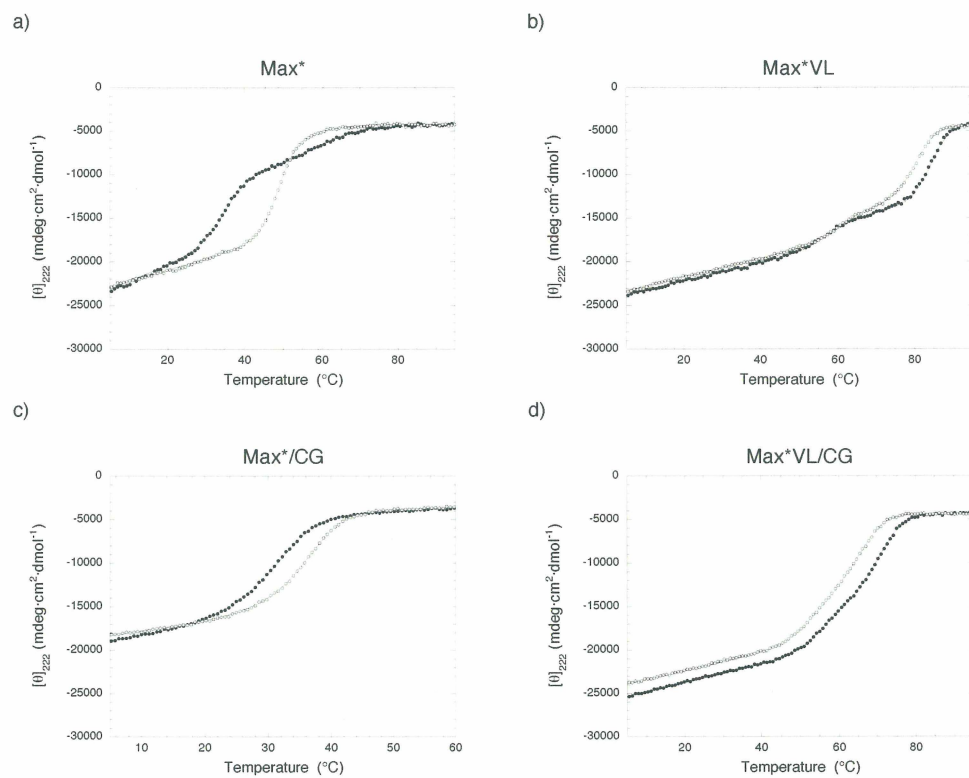




Figure 4

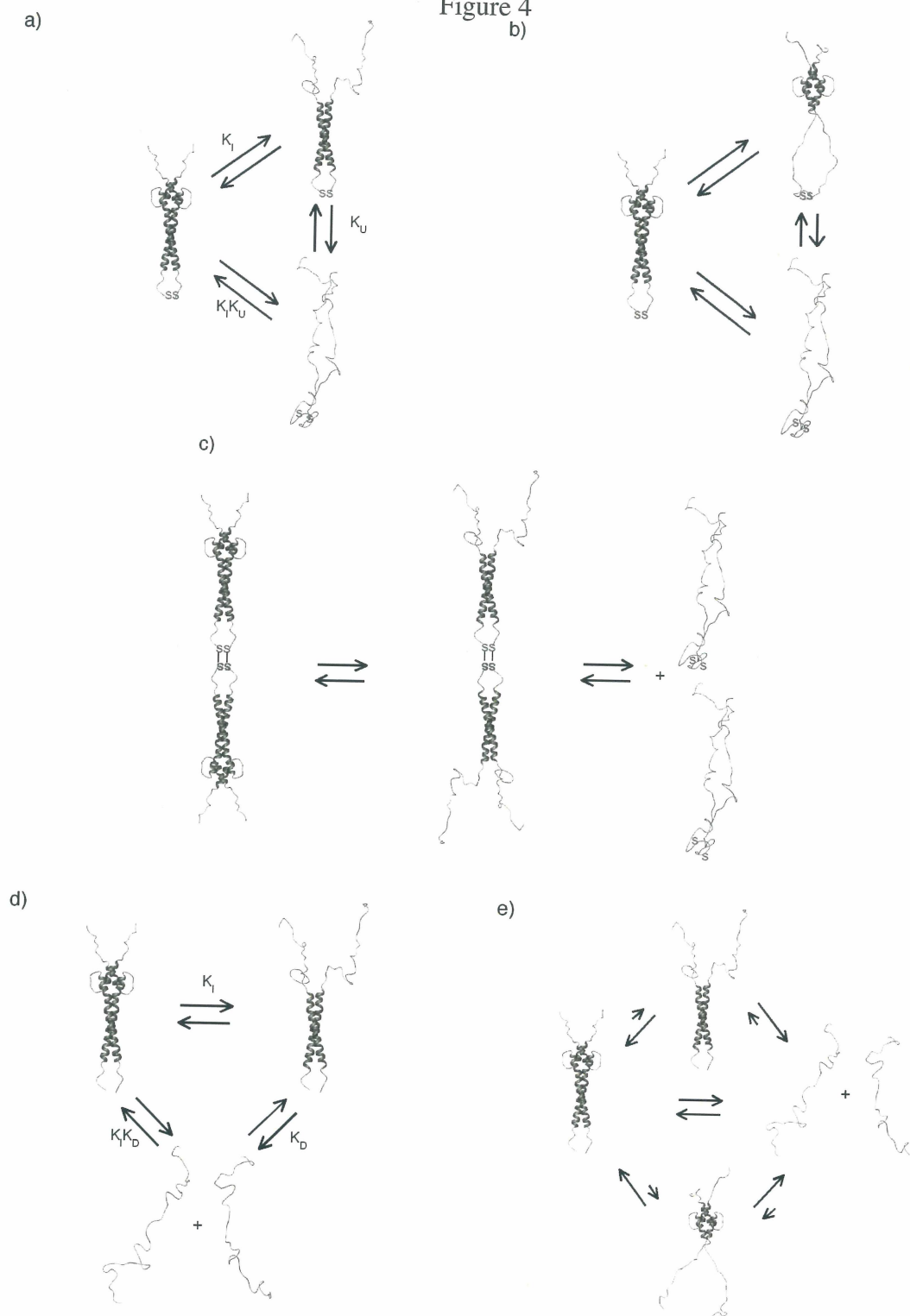
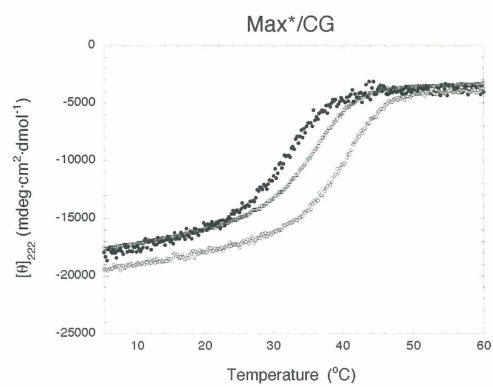
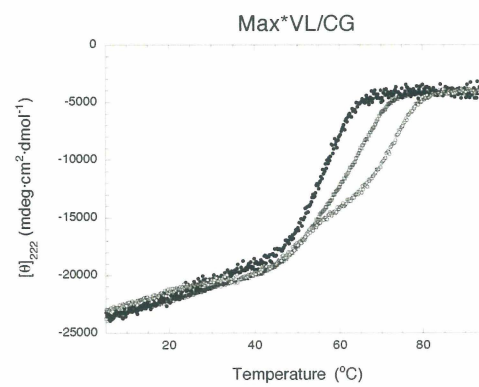


Figure 5

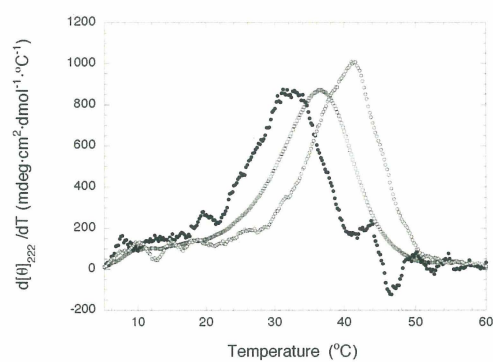
a)



b)



c)



d)

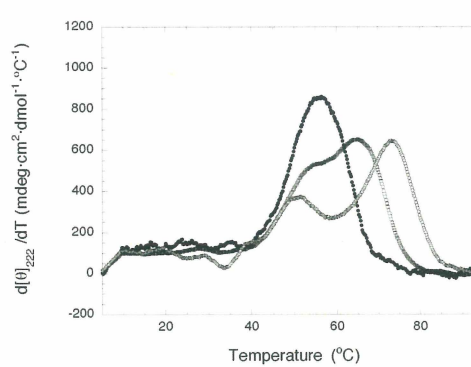


Figure 6

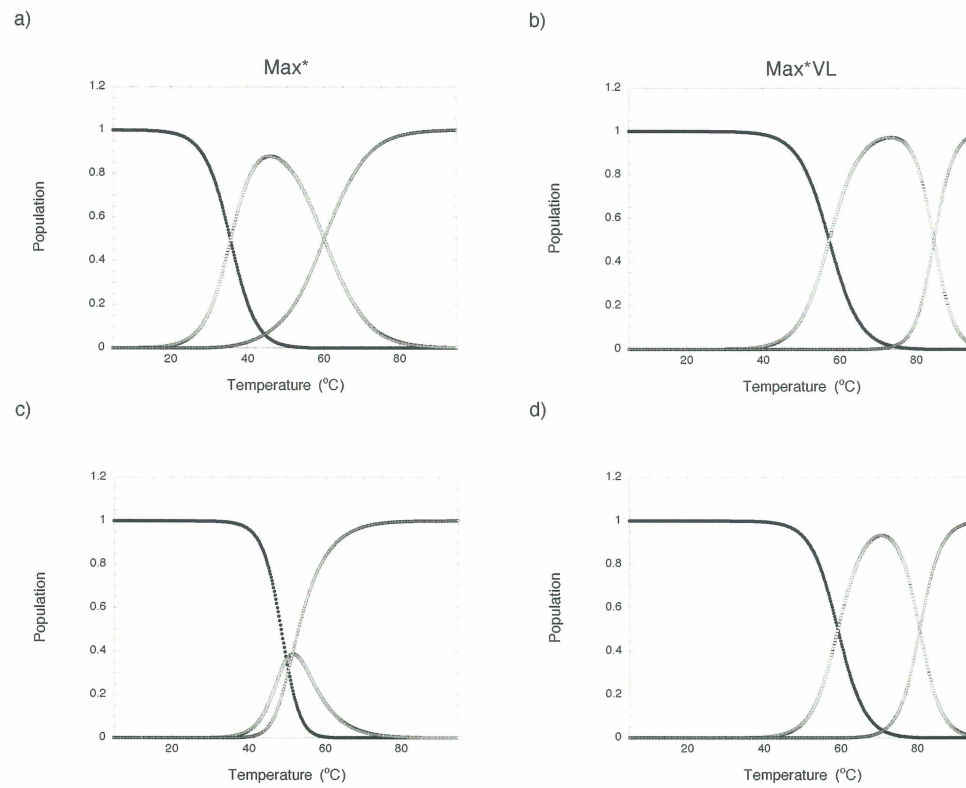


Figure 7

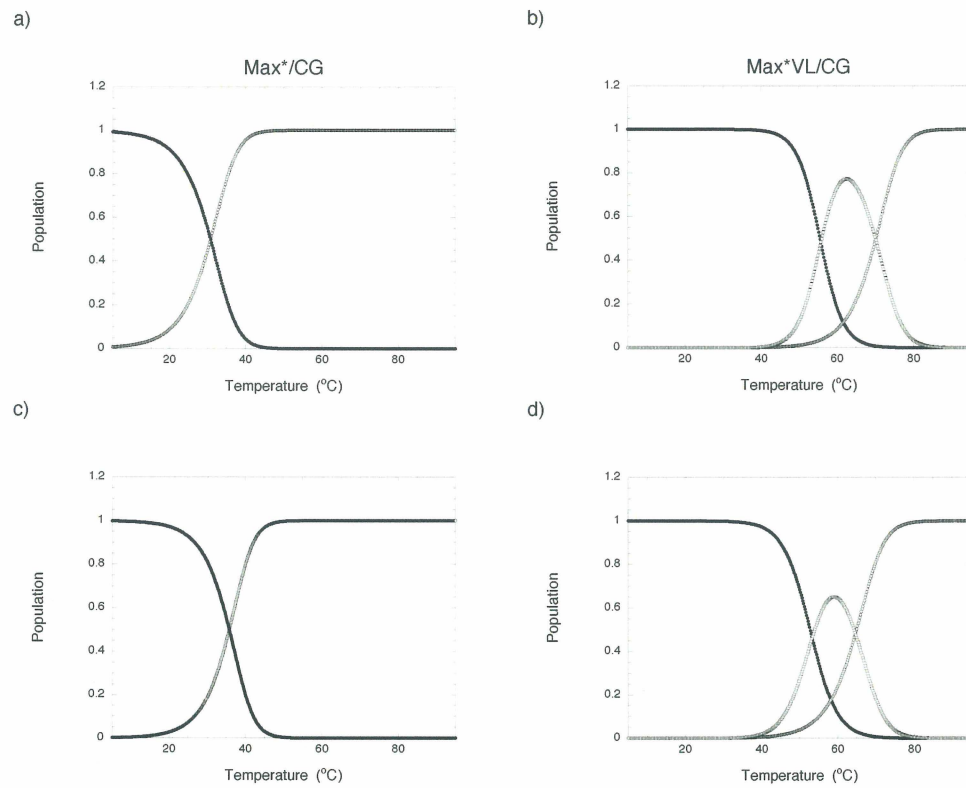


Figure 8

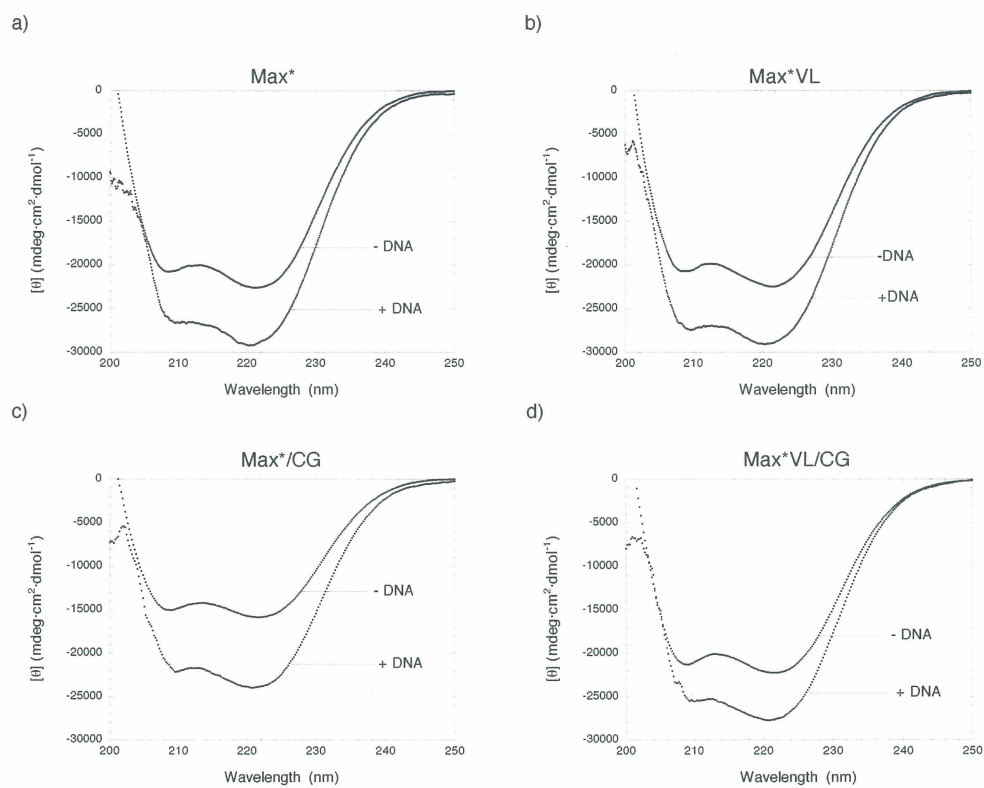
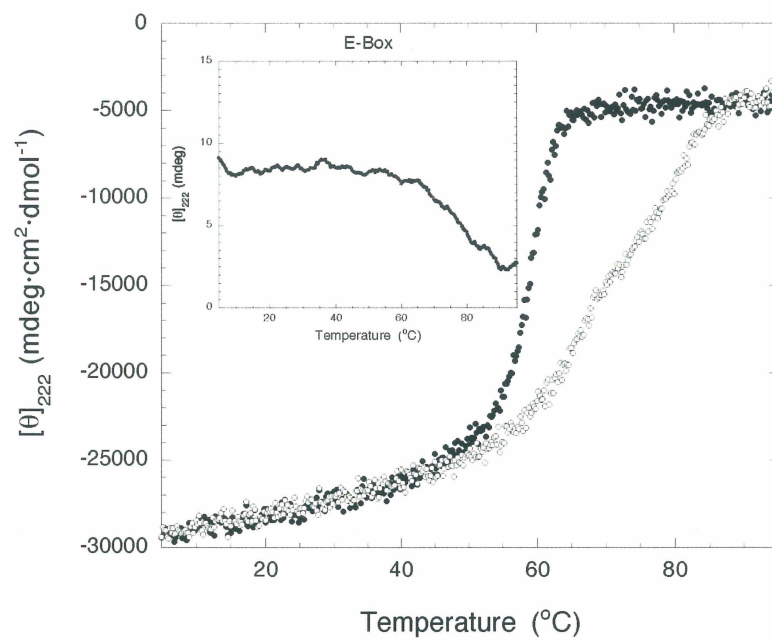


Figure 9

a)



b)

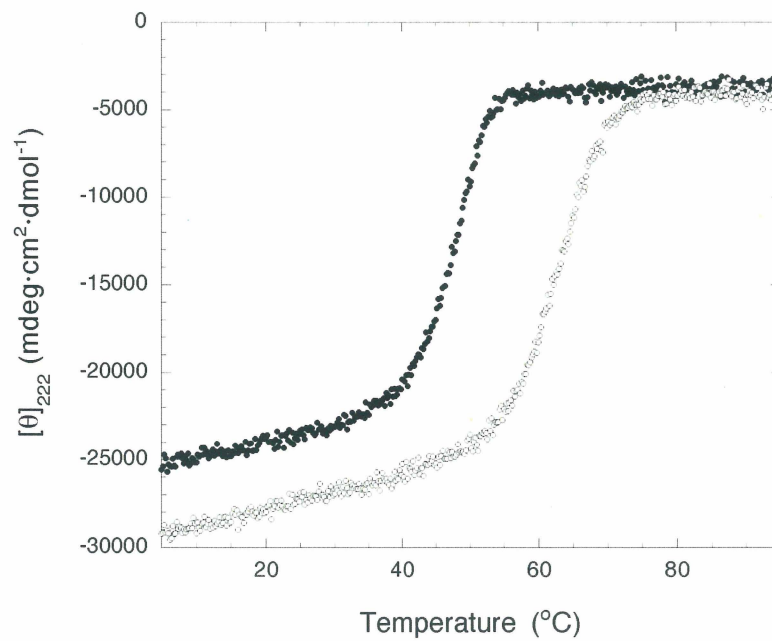


Table 1

Max*							
H1-L-H2 <sup>a</sup>				LZ <sup>b</sup>			
pH	T°	$\Delta H^\circ_U$	$\Delta G^\circ_U(37^\circ)$	pH	T°	$\Delta H^\circ_U$	$\Delta G^\circ_U(37^\circ)$
3.8	60.3	38.3	2.32	3.8	35.5	54.4	-0.28
6.8	51.1	38.0	1.52	6.8	49.6	72.0	2.65
Max*VL							
H1-L-H2 <sup>a</sup>				LZ <sup>b</sup>			
pH	T°	$\Delta H^\circ_U$	$\Delta G^\circ_U(37^\circ)$	pH	T°	$\Delta H^\circ_U$	$\Delta G^\circ_U(37^\circ)$
3.8	57.3	54.3	3.07	3.8	84.8	98.3	11.13
6.8	59.3	62.5	3.88	6.8	80.7	85.5	8.87

<sup>a</sup>This conformational transition is assigned to the unfolding of the HLH domain. On the other hand, it is difficult to assess to which extent the H2 is unfolding solely based on the percentage of helical content loss during the transition.

<sup>b</sup>This conformational transition is assigned to the unfolding of the LZ domain. On the other hand, it is difficult to assess to which extent the H2 is participating to the unfolding solely based on the percentage of helical content loss during the transition.

Table 2

Max*/CG							
H1-L-H2-LZ							
pH		T°		$\Delta H^{\circ}_U$		$\Delta G^{\circ}_U(37^{\circ})$ (K <sub>D</sub> )	
3.8		32.0		72.5		4.41 (1.81 X 10 <sup>-4</sup> )	
6.8		37.0		87.7		5.65 (1.04 X 10 <sup>-4</sup> )	
Max*VL/CG							
H1-L-H2 <sup>a</sup>				LZ <sup>b</sup>			
pH	T°	$\Delta H^{\circ}_U$	$\Delta G^{\circ}_U(37^{\circ})$	pH	T°	$\Delta H^{\circ}_U$	$\Delta G^{\circ}_U(37^{\circ})$ (K <sub>D</sub> )
3.8	55.5	71.5	3.82	3.8	71.4	96.1	14.18 (1.02 X 10 <sup>-10</sup> )
6.8	52.7	59.5	2.72	6.8	66.2	88.1	12.45 (1.68 X 10 <sup>-9</sup> )

<sup>a</sup>This conformational transition is assigned to the unfolding of the HLH domain. On the other hand, it is difficult to assess to which extent the H2 is unfolding solely based on the percentage of helical content loss during the transition.

<sup>b</sup>This conformational transition is assigned to the unfolding of the LZ domain. On the other hand, it is difficult to assess to which extent the H2 is participating to the unfolding solely based on the percentage of helical content loss during the transition.



### **3.2 Caractérisation structurale et thermodynamique du produit de gène complet de p21 Max**

**Chapitre publié dans Biochemistry (2005) 44(38): 12746-58.**

#### **Contribution personnelle :**

##### Manipulation :

J'ai effectué le clonage de la protéine p21 Max dans un vecteur d'expression procaryotique et j'ai fait la même double mutation à l'intérieur du domaine leucine zipper que celle accomplie sur le domaine b-HLH-LZ. Cette double mutation a aussi été réalisée par mutagenèse dirigée par PCR. L'expression et la purification de ces deux protéines ont été accomplies avec les mêmes bactéries que celles utilisées pour le domaine b-HLH-LZ et la purification a aussi été réalisée par FPLC sur colonne cationique à l'aide d'un tampon légèrement différent. Cette fois, j'ai procédé à l'analyse par spectroscopie de dichroïsme circulaire mais aussi à la simulation des courbes de dénaturation obtenues pour déterminer les paramètres thermodynamiques. J'ai aussi procédé à la production et au marquage de la protéine pour faire un échantillon RMN. Simon Sauvé m'a aidé dans la prise des spectres RMN. François-Olivier McDuff a procédé aux analyses par dichroïsme circulaire à différentes concentrations de sel et Bradley A. Webb a accompli les analyses d'ultracentrifugation à l'équilibre dans le laboratoire du Dr Steven P. Smith à l'université Queen's. De façon plus détaillée, ma contribution se reflète dans la

publication par la production des figures 1 a-b, 2 a-b, 4 a-b, 7, 8 (partiellement), 9 a-b, 10 a-b, et la figure 11 ainsi qu'à la détermination des valeurs du tableau 1 et 2.

#### Rédaction de l'article :

J'ai participé à l'écriture de l'article à 70% avec l'aide et la supervision du Dr. Pierre Lavigne et du Dr. Benoit Chabot. J'ai assemblé toutes les figures et tableaux. Martin Montagne a participé à la rédaction de l'article en corrigeant celui-ci et en apportant de nombreux points critiques.

#### **Pertinence de l'article dans le projet de recherche :**

Cet article est la suite logique de l'article précédent puisque nous avons étudié la dimérisation, la structure et la stabilité de l'un des deux isoformes de la protéine Max, nommé ici p21 Max. Puisque nos études *in vivo* seront effectuées avec la protéine complète, il était important de déterminer la stabilité de celle-ci et l'effet de la double mutation sur cette stabilité. Aucune étude n'avait caractérisé cette protéine, nous avons donc rapporté pour la première fois que la protéine complète était plus stable que son domaine b-HLH-LZ. L'impact de cette observation permet d'avancer que la protéine pourrait exister sous la forme d'un homodimère à l'intérieur du noyau cellulaire. Pour terminer, la double mutation stabilise encore l'homodimère nous indiquant que ce mutant pourrait selon notre hypothèse être un excellent inhibiteur de l'activation de la transcription menée par l'hétérodimère c-Myc/Max.

## Structural and Thermodynamical Characterization of the Complete p21 Gene Product of Max<sup>†</sup>

*Jean-François Naud §‡, François-Olivier McDuff §, Simon Sauvé§, Martin Montagne §,*

*Bradley A. Webb<sup>+</sup>, Steven P. Smith<sup>+</sup>, Benoit Chabot ‡ and Pierre Lavigne §\**

†- Grants (PL and BC) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) supported this work. Pierre Lavigne acknowledges the Fonds de la Recherche sur la nature et les technologies du Québec for a scholarship. Benoit Chabot is the recipient of a Canada Research Chair in Functional Genomics. Jean-François Naud is supported in part by Centre de Recherche Clinique (CRC) oncology group.

§- Département de pharmacologie, ‡- Département de microbiologie et d'infectiologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc, Canada, J1H 5N4

+ - Department of Biochemistry and Protein Function Discovery Group Queen's University, Kingston, On, K7L 3N6

\*All correspondence should be addressed to: Pierre Lavigne, Département de pharmacologie, Faculté de médecine, 3001 12e ave nord, Fleurimont, Québec, Canada,

J1H 5N4, Tel: 819-820-6868 ext. 15462, Fax: 819-564-5400, E-mail:

[Picrre.Lavigne@USherbrooke.ca](mailto:Picrre.Lavigne@USherbrooke.ca)

Running title: Structural and Thermodynamical Characterization of p21 Max

### **Abbreviations and Textual Footnotes**

b-HLH-LZ: basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper.

NMR: Nuclear Magnetic Resonance.

NLS: Nuclear Localisation Sequence

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy

TROSY: Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy.

## Abstract

The b-HLH-LZ family of transcription factors contains numerous proteins including the Myc and Mad families of proteins. Max heterodimerizes with other members to bind E-Box DNA sequence in target gene promoters. Max is the only protein in this network that recognizes and binds E-Box DNA sequences as a homodimer *in vitro* and represses transcription of Myc target genes *in vivo*. Key informations such as the structure of p21 Max, the complete gene product, and its  $K_D$  in the absence of DNA are still unknown. Here, we report the characterization of the secondary and quaternary structures, the dimerization and DNA binding of p21 Max and a thermodynamically stable mutant. The helical content of p21 Max indicates that its N-terminal and C-terminal regions are unstructured in the absence of DNA. NMR experiments further support the location of folded and unfolded domains. We also show that p21 Max has an apparent  $K_D$  (37°C) of  $7 \cdot 10^{-6}$ , a value 10-100 times smaller than the b-HLH-LZ itself. We demonstrate that electrostatic repulsions are responsible for the higher  $K_D$  of the b-HLH-LZ. Finally, we show that a p21 Max double mutant forms a very stable dimer with a  $K_D$  (37°C) of  $3 \cdot 10^{-10}$  and that the protein/DNA complex depicts a higher temperature of denaturation than p21 Max/DNA complex. Our results indicate that Max could homodimerize, bind DNA and repress transcription *in vivo* and that its mutant could be more efficient at repressing the expression of c-Myc target genes.

The protein Max has been first discovered as a Myc interacting protein (1). It is the obligate partner of Myc (c-Myc, N-Myc, L-Myc) and Mad (Mad 1, Mxi 1, Mad 3, Mad 4) proteins. These proteins are all members of the b-HLH-LZ family of transcription factors. The b-HLH-LZ domain mediates molecular recognition and DNA binding. As a heterodimer with the proteins of Myc family, Max can bind E-Box sequences (CACGTG) in promoters of Myc target genes, recruit protein complexes with histone acetyl transferase (HAT) activities or PTEFb complexes and activate transcription (2-3). The recruitment of co-activator proteins is mediated by the Myc Box I and II (MBI and MBII) in the transactivating domain. c-Myc/Max heterodimer can also repress transcription through the interaction with Miz-1. This interaction is mediated by the HLH, the MBI and MBII domains of c-Myc and is independent of E-Box DNA binding (4-7). As a heterodimer with proteins of Mad family, Max can also bind E-Box sequences and recruit co-repressor complexes containing histone deacetylase (HDAC) activities. The mSin3 interacting domain (SID) on Mad proteins is responsible for the recruitment of these large complexes (2, 8-9). While Max can bind E-Box sequences as a homodimer, it apparently lacks domains that actively recruit co-activators or co-repressors and is therefore thought to possess no transcriptional regulatory role as a homodimer. On the other hand, overexpression of Max can repress Myc target genes and limits cell proliferation (10-11). The mechanism by which this is achieved apparently involves a competition with endogenous c-Myc/Max heterodimers for E-Box DNA sequences in promoters of Myc target genes. Recently, Max and Mad proteins were shown to be upregulated by TGF- $\beta$  (12). It is therefore suggested that Mad/Max heterodimers may play a major role in the mechanism responsible for the cytostatic effect of TGF- $\beta$ . But, a

transient repressor role for the Max homodimer cannot be ruled out given that the  $K_D$  of p21 Max and its solution structure in the absence of DNA are unknown. We have characterized the overall secondary and quaternary structures of p21 Max and p21 Max VL (N69V/H72L double mutation located in the LZ) and determined their apparent  $K_D$  to gain a better understanding of the molecular determinants dictating the homodimerization of Max. We determine by circular dichroism that the apparent  $K_D$  (37°C) of p21 Max is  $7 \cdot 10^{-6}$ . Interestingly, the  $K_D$  of p21 Max is 10-100 times lower than the  $K_D$  ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) for b-HLH-LZ domains. This indicates that the N- and C- terminal portions of p21 are involved in the stabilization of the homodimer. We provide evidences, both experimental and theoretical, suggesting that the stabilization of p21 Max homodimer by the N- and C-terminal regions is from electrostatic origin. We also show that N69V/H72L double mutation in the LZ domain decreases the apparent  $K_D$  (37°C) to  $4 \cdot 10^{-10}$  of p21 Max VL. Finally we show that this increase in stability of p21 Max VL homodimer stimulates DNA complex formation. Altogether our results indicate that, at physiologically relevant concentrations, p21 Max can dimerize, bind DNA and that DNA binding can be improved by the stabilization of its LZ. Our results support a functional role for Max in the reversible repression of transcription of Myc target genes.

## **Experimental procedures**

Construction of pET3a expression plasmid encoding p21 Max and p21 Max VL

To obtain p21 Max, a polymerase chain reaction was performed using pVZ1 max (kindly provided by R. N. Eisenman, Fred Hutchinson Cancer Research Centre, Seattle, Wa) as template. The 5' and 3' primers contained NdeI and BamHI restriction sites, respectively. The plasmid pET3a (Novagen) and PCR products were digested with the corresponding restriction enzymes and purified on agarose gel using QUIAquick gel extraction kit (Qiagen) before the ligation. The construct encoding p21 Max VL was obtained by site directed mutagenesis as described before (13).

### Protein expression and purification

All proteins were prepared by induction of pET3a constructs in *Escherichia coli* with IPTG. The bacteria were grown either in LB or M9 media for the preparation of uniformly  $^{15}\text{N}$  labeled protein. In the later case  $^{12}\text{C}$ -Glucose and  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  were used as the sole source of carbon and nitrogen, respectively. The total protein extract was purified by cation-exchange chromatography. Briefly, after induction, cells were centrifuged at 4000 rpm in Sorvall SLA-1500 rotor. Supernatant was discarded and pellet was resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 M NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  and 0.1% NP-40). DNase I was added and the solution was incubated at 37°C for one hour. To precipitate DNA and acidic proteins, PEI was added and the solution was centrifuged at 20 000 rpm in a Sorvall SS34 for 30 min. The supernatant was kept, diluted in 5 volumes of buffer A (50 mM sodium acetate (pH 5.0)) and loaded on a HiTrap SP sepharose HP (Amersham Biotech) preconditioned with buffer A. The column was washed with five volumes of buffer B (50 mM sodium phosphate monobasic (pH 2.8), 2M urea). Elution of p21 Max



and Max VL was achieved with a gradient of buffer C (50 mM sodium phosphate monobasic (pH 2.8), 2M urea, 3M NaCl) from 0% to 100%. Fractions containing p21 Max WT and p21 Max VL was then desalted on HiTrap size-exclusion columns and lyophilized. The proteins were resuspended in phosphate buffer (50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 100 mM NaCl) and concentrations of the stock samples were determined with Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) and spectrophotometrically at 280 nm.

#### Circular dichroism and simulation of the temperature denaturation curves

Circular dichroism measurements were performed on a Jasco J-810 spectropolarimeter equipped with a Jasco Peltier-type thermostat. The instrument was calibrated with an aqueous solution of d-10- (+)-camphor-sulfonic acid at 290.5 nm. Samples were loaded into quartz cells with a path length of 0.1 cm. Far-UV CD spectra were recorded at the desired temperature from 200 nm to 250 nm by averaging three scans at 0.1 nm intervals. The raw data were transformed in mean residue molar ellipticity ( $[\theta]_{MRW}$ , deg·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>) using the equation:  $[\theta]_{MRW} = \frac{[\theta] \cdot MRW}{c \cdot l \cdot 10}$ , where  $[\theta]$  is in degree, MRW is the molecular weight divided by the number of residues, c is in g/ml and l is in cm. Sample of proteins from the stock solutions were diluted to the desired concentration in 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 100 mM KCl for p21 Max and p21 Max VL. Temperature-dependent denaturations were performed from 5°C to 95°C with a heating rate of 1°C/min. The unfolding was recorded at 222 nm. For DNA studies, the dsDNA was created as described (13) and used at the desired concentration in 50 mM potassium phosphate (pH 6.8), 100 mM KCl. For experiments made at different salt concentrations, the b-HLH-LZ

of Max (Max\*) was purified as described before (13). All proteins were diluted to a final concentration of 32  $\mu\text{M}$  (in monomer unit) and thermal-denaturations were recorded as before in 50 mM potassium phosphate (pH 6.8) with salt concentrations ranging from 0-500 mM KCl for Max\* and 0-250 mM for p21 Max. The determination of the apparent  $K_D$  was performed by the simulation of the temperature denaturation curves with equations describing the equilibrium between a dimer and two monomers for p21 Max or between a dimer and two monomers with an intermediate state or p21 Max VL as described by Naud et al. (13). The calculated  $[\theta]_{222}$  for a 151 amino acids  $\alpha$ -helical protein was determined using the equation from Chen et al (14).

#### NMR spectroscopy

Uniformly  $^{15}\text{N}$ -labeled protein (p21 Max and p21 Max VL) were dissolve in 50 mM phosphate 100 mM KCl containing 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ , DSS and 50 mM  $\text{NaN}_3$  at pH 6.8 and approximately 1mM concentration. All experiments were run on a Varian INOVA spectrometer operating at a  $^1\text{H}$  frequency of 600 MHz and equipped with an indirect detection triple-resonance ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ) probe with Z-axis pulsed-field gradients capability. The 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-TROSY (15-16) experiments for Max\*VL and p21 Max VL were run at 45 °C. Spectra were collected with 152 transients of 768 data points and 200  $t_1$  increment. The first increment of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-TROSY of p21 Max was run at 35°C with 10000 transients of 768 data points and those of Max\*VL and p21 Max VL were run at 45°C with 1000 and 10000 transient of 768 data points, respectively. The

$^1\text{H}$  1D experiments were run at 35°C with pre-saturation of the  $^1\text{H}$  water resonance. All experiments were processed with NMRPipe (17) and analyzed with NMRView (18).

#### Analytical ultracentrifugation

Samples used in analytical ultracentrifugation (AUC) were dialyzed extensively against 50 mM phosphate buffer (pH 6.8), 100 mM KCl, which was saved and used in the reference sector for all runs. All AUC experiments were performed at 20°C. Sedimentation equilibrium analysis was performed with a Beckman XL-I analytical ultracentrifuge with a four-hole An-60Ti rotor using 6-sector Epon charcoal centerpieces. Data was collected at 280 nm at 3 rotor speeds (15 000, 18 000, and 21 000 rpm) and at three protein concentrations (0.2, 0.4, and 0.6 mg/mL) for p21 Max p21 Max VL. Absorbance measurements were taken at 0.002 cm radial steps and averaged over ten observations. Data sets were collected after equilibrium was obtained, as judged by the successive overlay of scans at 2-hour intervals. The partial specific volume and solution density were calculated using SEDNTERP (version 1.05, John Philo, 2000). The molecular weight for both a single ideal species and a monomer-dimer interaction were obtained using the XL-A/XL-I data analysis software (version 6.03, Beckman/Microcal).

The sedimentation velocity analyses were carried out at 20°C in cells containing double-sector Epon charcoal centerpieces. Velocity runs for p21 Max and p21 Max VL were conducted at 50 000 rpm using Rayleigh interference optics. Interference scans were taken at intervals of 1 minute for 400 scans. Best-fit profiles according to the

continuous distribution  $c(S)$  Lamm equation model from SEDFIT (19) were overlaid on the experimental data using every 2<sup>nd</sup> scan.

### Molecular modeling

Molecular modeling was performed on a SGI Octane 2 workstation using the Insight II suite (Accelrys). To generate model for the folded p21 Max, the polypeptide chain corresponding to its primary structure was constructed in the extended state with the Biopolymer module. Residues corresponding to the folded domains of the b-HLH-LZ were template forced onto the structure of Max VL (1R05.pdb) (20) using the Discover module. We have subsequently run series of molecular dynamics simulations on the N- and C-terminal regions, while fixing the coordinates of the b-HLH-LZ, to randomize the dihedral angles of the extended form using the Discover module and the CVFF force field. The electrostatic potential maps were calculated with the Poisson-Boltzman equation solver included in the program Grasp (21) using the default parameters and interpolated at the molecular surface at the same intensity to allow for relative comparison. All rendering were done with the program Ribbons (22).

### Results

**The p21 Max homodimer is more stable than the b-HLH-LZ homodimer and its LZ domain is less stable than its HLH domain.**

In order to characterize the secondary structure of p21 Max (Figure 1a), far-UV circular dichroism (CD) spectrum was recorded at a concentration of 32  $\mu\text{M}$  (monomer units), pH 6.8 and 20°C (Figure 2a). p21 Max has the typical CD spectrum expected for a mixture of random coil and  $\alpha$ -helix. This is further supported by the isodichroic point observed at 203 nm indicating that p21 Max has only  $\alpha$ -helical structure and random coil without significant contribution of  $\beta$ -sheet (data not shown). The isodichroic point is obtained by superimposition of CD spectra at different temperature. According to the equation of Chen et al (14), the theoretical mean residue molar ellipticity at 222 nm ( $[\theta]_{222}$ ) expected for a protein of 151 amino acids 100 %  $\alpha$ -helical is  $-38\,400\text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ . The  $[\theta]_{222}$  observed for p21 Max is  $-13\,200\text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  indicating that the equivalent of 34% or 52 residues are  $\alpha$ -helical in the absence of DNA. As reported elsewhere, the basic region of b-HLH-LZ of Max is mostly unfolded in the absence of DNA (13, 20) with only the last four residues being helical (20). It can be calculated that if the LZ, H1 and H2 domains were fully helical, plus the 4 residues of the basic region, this would amount to 60 residues or a  $[\theta]_{222}$  of approximately  $-16\,000\text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ . Hence it appears that, under these conditions, the N- and C-termini of p21 Max are random coil and that p21 Max exists as either a 86% population of a dimer with a b-HLH-LZ optimally folded or a 100 % population of a dimer with 14 % of the b-HLH-LZ unfolded. To further explore this aspect and to determine the apparent  $K_D$  of the p21 Max, we recorded its thermal denaturation by monitoring the molar ellipticity at 222 nm as a function of temperature. On the basis of the sedimentation equilibrium analysis result (See below and Figure 3a), denaturation curve was simulated with a thermodynamical model consisting of a two-state reaction of dimer dissociation coupled to the unfolding of monomers, as described

in details in Naud et al (13) (Figure 2b). We initially tried, without success, to simulate the denaturation using a baseline for the folded state having  $[\theta]_{222}$  values around  $-16\,000\text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  corresponding to a optimally folded b-HLH-LZ. This suggests that p21 Max is a partially folded dimer having 86 % of the optimal ellipticity of the b-HLH-LZ at room temperature. Indeed, we could fit the denaturation with values for the native state of  $-14\,700\text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  and from this simulation we could determine an apparent  $K_D$  ( $20^\circ\text{C}$ ) of  $6.5 \cdot 10^{-9}$  which corresponds to a population of 99% of the dimeric state at  $32\text{ }\mu\text{M}$ . The apparent  $K_D$  ( $37^\circ$ ) is  $7.2 \cdot 10^{-6}$  and the corresponding  $\Delta G_D^\circ$  ( $37^\circ\text{C}$ ),  $\Delta H_D^\circ$  ( $37^\circ\text{C}$ ) and  $T^\circ\Delta S_D^\circ$  ( $37^\circ\text{C}$ ) were  $7.3\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $83.15\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  and  $78.85\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , respectively (Table 1). The  $\Delta G^\circ$  (T),  $\Delta H^\circ$  (T),  $T\cdot\Delta S^\circ$  (T) and the population plots can be found in supplementary material. The analysis of the crystallographic structure in the presence of DNA reveals that LZ of p21 Max is not well ordered, supporting our CD data and indicating that the dimeric b-HLH-LZ of p21 Max is only partially folded with the LZ domain undergoing a microscopic reversible folding-unfolding transition within macroscopic folded dimeric state (23). This is supported by the fact that the LZ in the crystal structure of the b-HLH-LZ domain of Max also frays towards its C-terminal end (24). Furthermore, proteolysis of Max b-HLH-LZ has shown that the LZ domain was more susceptible to cleavage by many endoproteases than the HLH (24), indicating that LZ is less thermodynamically stable (13). Taken together, our data strongly suggest that the N- and C-terminal flanking regions of the b-HLH-LZ of p21 Max are unfolded and that p21 Max is a b-HLH-LZ dimer with an unstable LZ domain. Finally, the  $K_D$  observed for p21 Max ( $7.2 \cdot 10^{-6}$ ) is lower than the  $K_D$  reported for the b-HLH-LZ ( $10 \cdot 10^{-5}$ ) (13, 26). Interestingly, lower  $K_D$ s were reported for the b-HLH-LZ domain by

Krylov *et al* with a  $K_D$  (37°) of  $6 \cdot 10^{-6}$  (27). On the other hand, it is important to notice that their temperature-denaturations were done at higher KCl concentration and pH than in our experiments. As described below, salt concentration has a profound effect on the stability of Max b-HLH-LZ. In addition, the Max b-HLH-LZ stability is very sensitive to pH around 7 with His72 located directly at the interface. Considering a generic pKa of 6.5, the protonation state of His72 will change drastically from 6.8 to 7.4 and will become mostly neutral at the latter pH. Protonation of His72 has been shown to be very destabilizing and enough to unfold the LZ domain at low pH (13). Accordingly, others (26) and we (data not shown) have observed that increasing the pH from 6 to 8 significantly stabilizes the Max b-HLH-LZ homodimer explaining why our reported value is slightly higher than the one previously reported by Krylov *et al*. However, the  $K_D$  of p21 Max is similar to that obtained by Horiuchi *et al* ( $8 \cdot 10^{-6}$ ) for a truncated Max (p110) containing the first 110 amino acids and determined at pH 6.8 (28).

So far, our structural and thermodynamical characterization indicates that the LZ of p21 Max is most likely fraying and that the N-terminal and possibly the C-terminal portions could influence the dissociation constant of the protein even though they are not structured. As described below, evidence leads to suggest that this effect might be from electrostatic origins.

**The N69V/H72L mutations promotes the folding of the LZ domain and improves the stability of the p21 Max dimer**

In order to verify the hypothesis that the LZ domain of p21 Max is undergoing unfolding-folding reaction in its dimeric state, we have proceeded to a double mutation (N69V and H72L) targeted at stabilizing the LZ domain. Residues N69a and H72d in the LZ domain of p21 Max have been proposed to be key determinants in the molecular recognition of Max with the Myc and Mad proteins by promoting the dissociation of homodimers and encouraging specific interactions at the interface of heterodimers (e.g. c-Myc/Max and Mad1/Max) (29-31). Mutation of these two residues in the b-HLH-LZ domain of Max dramatically increases thermodynamic stability of the LZ and the b-HLH-LZ homodimers (13). This increase in stability was accompanied by an increase in  $\alpha$ -helical content that matches the expected one for a fully folded HLH-LZ. Therefore, if the LZ domain of p21 Max is fraying, this double mutation should increase the thermodynamical stability and increase the helical content to that expected for a fully folded LZ domain. In order to verify the effect of these mutations on the secondary and quaternary structures of the complete gene product, we have made p21 Max VL (Figure 1a) and characterized it by CD as described in the previous section for p21 Max. The CD spectrum obtained at pH 6.8 and 20°C is typical of a mixture between random coil and  $\alpha$ -helical structures (Figure 4a). The  $[\theta]_{222}$  of p21 Max is - 16 600 deg·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup> indicating that the  $\alpha$ -helical content of the double mutant is nearly 43% or equivalent to 65 residues folded in an  $\alpha$ -helical conformation. Recently, the solution-NMR structure of the b-HLH-LZ bearing the same double mutation has been solved (20). Residues from R27 in the b-region to V41 in the H1 and residues from R51 in H2 to E94 in LZ (Figure 1a) were found to be in a  $\alpha$ -helical conformation. These amounts to 60 residues, a figure close to the 65 residues estimated from CD spectrum. This strongly suggests that part of the b



region, H1, H2 and LZ of p21 Max VL are  $\alpha$ -helical and that the missing  $\alpha$ -helical content of p21 Max is located in the LZ domains. To estimate the  $K_D$  (37°C) of p21 Max VL we have performed thermal denaturation (Figure 4b). The denaturation curve could not be simulated by a simple two-state denaturation reaction like p21 Max. This indicates that an intermediate state is populated and confirms previous results obtained with the b-HLH-LZ (13). The intermediate state corresponds to a dimeric state where the LZ is folded while the HLH is unfolded. The dimeric state of p21 Max was verified by sedimentation equilibrium analysis to ensure that the double mutation did not promote oligomerization as described below (Figure 3b). In Fig 4b, we show the simulation of the denaturation curve according to this model by a solid line. The thermodynamical parameters obtained from the simulation are summarized in Table 1. The  $\Delta G_I^\circ(37^\circ\text{C})$ ,  $\Delta H_I^\circ(37^\circ\text{C})$  and  $\Delta S_I^\circ(37^\circ\text{C})$  for the transition between the native and the intermediate dimeric state were found to be equal to 4.1 kcal·mol<sup>-1</sup>, 59.8 kcal·mol<sup>-1</sup> and 55.7 kcal·mol<sup>-1</sup>, respectively. The  $\Delta G_D^\circ(37^\circ\text{C})$ ,  $\Delta H_D^\circ(37^\circ\text{C})$ , and  $\Delta S_D^\circ(37^\circ\text{C})$  for the transition between the native dimeric state and the unfolded monomeric state were found to be equal to 13.5 kcal·mol<sup>-1</sup>, 68.3 kcal·mol<sup>-1</sup> and 54.9 kcal·mol<sup>-1</sup>, respectively. The corresponding  $\Delta G^\circ(T)$ ,  $\Delta H^\circ(T)$  and  $T \cdot \Delta S^\circ(T)$  plots can be found in the Supplementary Material. The  $\Delta G_D^\circ(37^\circ\text{C})$  indicates a  $K_D$  (37°C) of p21 Max VL that is 10000 fold lower than the value of p21 Max ( $3 \cdot 10^{-10}$ ). These results support that the LZ domain of p21 Max is fraying in its dimeric state and that residues N69a and H72d are key determinants for the destabilization of p21 Max and its reversible dimerization.

**Assertion of the dimeric state of p21 Max and p21 Max VL by sedimentation equilibrium and velocity analytical ultracentrifugation.**

To assess the impact of the mutation on the oligomeric state of p21 Max, we used sedimentation equilibrium and velocity analytical ultracentrifugation (AUC). Fitting of the sedimentation equilibrium AUC data to a single species model, the apparent weight-average molecular masses of p21 Max and p21 Max VL were approximately 39 kDa and 34 kDa (Table 2, Figure 3a, b), respectively and suggests that the N69V/H72L double mutation has not impact on the oligomeric state of p21 Max. Sedimentation velocity experiments were also performed to examine the hydrodynamic properties of p21 Max and p21 Max VL. Sedimentation profiles were evaluated by a continuous distribution  $c(s)$  Lamm equation model. When the sedimentation coefficient distribution was determined, major peaks of 2.33 S and 2.24 S corresponding to molecular masses of approximately 30.5 and 34.1 kDa, for p21 Max and p21 Max VL, respectively were revealed. Furthermore, in both cases no higher order oligomers were observed. The velocity data was also exploited to crudely model the shape of p21 Max and p21 Max VL constructs. Frictional ratios,  $f/f_o$ , of 1.5 and 1.69 were calculated for the two constructs. This implies that both p21 Max and p21 Max VL adopt asymmetric/elongated shapes in solution. This is in agreement with the solution structure of Max\*VL. Indeed, we have shown that Max\*VL undergoes severe rotational diffusion anisotropy and behaves as an axially symmetrical prolate ellipsoid with an anisotropy ratio of approximately 2 (20). Interestingly, the  $f/f_o$  of p21 Max VL is 10 % larger than that of p21 Max indicating that, hydrodynamically, p21 Max VL appears more asymmetric/elongated than p21 Max. This

is expected for p21 Max if its LZ domain undergoes a microscopic folding-folding transition. Because the LZ domain of p21 Max VL is stabilized, the shape adopted by p21 Max VL in solution will be, on a time average, more elongated. Thus, the sedimentation equilibrium and velocity experiments show that p21 Max and p21 Max VL proteins are both dimers, that p21 Max is less asymmetrical at the concentrations analyzed and that p21 Max constructs have the same shape in solution.

### **Localization of the secondary structure on p21 Max and p21 Max VL by NMR**

Although the helical content and  $K_D$  suggest that both p21 Max and p21 Max VL have the HLH and LZ domains folded and that the other regions of the proteins are unfolded, it is important to confirm the exact location of the  $\alpha$ -helical secondary structure. Therefore, specific and spectroscopic markers proving that LZ and HLH domains are folded need to be provided. In that regard, during the assignment of the  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  resonances (BioMagResBank accession number BMRB-5926) of Max\*VL, we have noticed that the  $\delta$ -methyl  $^1\text{H}$  of L55 were up-field shifted by a ring current effect from F34 (20). Indeed, the structure shows that the side-chain of L55 packs against the phenyl ring of F34 in the middle of the folded HLH hydrophobic core. In Figure 5a, the up-field region of the Max\*VL  $^1\text{H}$ -1D spectra is displayed and the shielded  $^1\text{H}$ -methyl of L55 are depicted. Other up-field shifted  $^1\text{H}$ -methyl resonances belonging to the HLH are also labeled (*L37*, *V41*, *L44*). If the HLH domains of p21 Max and p21 Max VL are similarly folded, the same resonances should be observed on their  $^1\text{H}$ -1D spectra. This is the case for both p21 Max (Figure 5b) and p21 Max VL (Figure 5c). As expected from the increased molecular

weight of the complete gene product constructs, the resonances of p21 Max and p21 Max VL are markedly broader in respect to Max\*VL. This is due by an increase in overall rotational correlation time and consequent decrease in  $T_2$ , which naturally leads to the line-broadening observed. Nevertheless, the same spectroscopic and domain specific markers are present and confirm the fact that the HLH domains of p21 Max and p21 Max VL are stably folded.

In order to further confirm the folded nature of HLH-LZ in the p21 constructs and the dynamical folded nature of the LZ domain in the case of p21 Max, we have recorded their  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-TROSY spectra (32) and compared them to the spectrum of Max\*VL (Figure 6a)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC spectra informs on the folded nature of proteins and the local magnetic environment of backbone (and side-chain)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  spin pairs. Therefore, if the folded regions of the different constructs are similar, the magnetic environment of the folded backbone  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  pairs should also be similar. Thus, the resonance frequencies of  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  cross-peaks assigned to the LZ and HLH of Max\*VL should appear in the spectra of the complete gene product. In Figure 6, the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-TROSY spectrum of Max\*VL (red) is superimposed onto the spectrum of p21 Max VL (blue). As expected, many assigned cross-peaks from the HLH domain of Max\*VL have corresponding cross-peak in the p21 Max VL spectrum (V41, G46 and Q53; Figure 6b) indicating that the HLH is similarly folded as inferred above from the presence of the two up-field shifted methyl resonances. Similarly, one can also note that many  $^1\text{HN}$  downfield cross-peaks, which correspond to the LZ domain, are found in p21 Max VL. In  $\alpha$ -helical proteins containing LZ domains, downfield backbone  $^1\text{HN}$  are usually involved in strong main

chain H-bonds and are located at the buried interface (e.g. K80 and L72). Although the environment of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  pair may not be exactly identical, we believe that it is reasonable to propose that the HLH-LZ of both p21 Max VL and Max\*VL are similarly and stably folded.

From Figure 6 one can also notice the obvious increase in linewidths of the cross-peaks of p21 Max VL compared to those of Max\*VL. It is noteworthy to report that the average  $^{15}\text{N}$ - $T_2$  values of Max\*VL are of the order of 30 ms (20). These are rather short and give rise to broad linewidths for a protein the size of Max\*VL (20 kDa). They represent  $^{15}\text{N}$ - $T_2$  values a globular protein almost twice that size would have. This was rationalized by the severe rotational diffusion anisotropy of Max\*VL as discussed above. Considering that the MW of p21 Max is almost twice the MW of Max\*VL, it is to be expected the  $^{15}\text{N}$ - $T_2$  of p21 Max will be markedly decreased and that the half-width at half-height (HWHH) of the resonances will be increased (33). Interestingly, the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-TROSY of p21 Max only showed well-resolved resonances belonging to the HLH (data not shown). We remind that the LZ domain of this construct is expected to undergo a microscopic folding-unfolding transition. This exchange phenomenon usually occurs on the ms time-scale, which can broaden the linewidth of resonances beyond detection (34). To illustrate the existence of a dynamical phenomenon in the LZ domain of p21 Max, we show in Figure 5, the first increment of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-TROSY spectra of Max\*VL (d), p21 Max (e) and p21 Max VL (f). One can see that the resonance of K80, which is located in the middle of the LZ domain and buried at the interface, is sharp in the spectrum of Max\*VL (Figure 5d). In accordance with the above discussion, the resonance of K80 is

significantly broader (larger HWHH) in the spectrum of p21 Max VL (Figure 5f) and is broadened almost beyond detection in the spectrum p21 Max spectrum (Figure 5e). Taken as a whole, the NMR and CD results presented so far support the fact that the helical content of both p21 Max VL and p21 Max, in its dynamically populated and fully folded state, is located in the HLH-LZ and that the N- and C-termini are essentially unfolded.

**The N- and C-terminal portions of p21 Max relieve electrostatic repulsions present in the b-HLH-LZ.**

As alluded to above, evidence suggests that the lower thermodynamical stability of the b-HLH-LZ compared to the complete protein is of electrostatic origin. Indeed, we have shown the existence of a cluster of positively charged side-chains at the interface of the HLH in the solution structure of the dimeric b-HLH-LZ of Max (20). This cluster generates high local electrostatic potential that induces significant molecular motions in the Helix 1 of the HLH on the ns time scale. We show on Figure 7a, the b-HLH of Max\* with the electrostatic potential interpolated at its molecular surface and displaying a net positive (blue) electrostatic potential. It is straightforward to propose that repulsions may destabilize the HLH and promote unfolding. On the other hand, what are the role N- and/or C-terminal regions in stabilizing the dimeric form of the complete gene product? Interestingly, the pIs of Max b-HLH-LZ, p110 and p21 Max are 9.69, 6.29 and 6.07, respectively. In fact, one can see in Figure 1, that the N-terminal region of Max is rich in acidic residues, explaining the decrease in pI of p110 and the complete gene product.

When the electrostatic potential is calculated and interpolated at the molecular surface of the b-HLH-LZ of p21 Max with an unfolded N-terminal region, it is apparent that the latter reduces significantly the net positive electrostatic potential at the interface of the b-HLH (Figure 7b). It is therefore possible that the N-terminus, even unstructured, could reduce the unfavorable electrostatic repulsions at the interface of the HLH in p21 Max, leading to a smaller  $K_D$  or an increased thermodynamical stability.

To further test this hypothesis, temperature-induced denaturations were recorded with the b-HLH-LZ of Max and p21 Max at 32  $\mu$ M in 50 mM phosphate buffer (pH 6.8) at different ionic strengths (0-500 mM KCl) in order to screen for the contribution of electrostatic repulsions (Figure 8). At 100 mM KCl and below 20 °C, the molar ellipticities and  $\alpha$ -helical content of the b-HLH-LZ and p21 Max are comparable, confirming that the dimers are folded similarly. However, the stability of p21 Max is insensitive to ionic strength while that of the b-HLH-LZ is largely increased by the ionic strength. This strongly supports our suggestion that electrostatic repulsions are present in the b-HLH-LZ and that the N- and C-terminal portions are lowering the  $K_D$  (increasing stability) of p21 Max by decreasing the destabilizing effect repulsions at the interface of the HLH in the complete gene product.

#### **p21 Max VL forms a more stable protein/DNA complex than p21 Max.**

As discussed in the introduction, in the light of a possible function of Max in the repression of the transcription of Myc target genes in cancer cells, an increase of the

stability of its complex with E-Box sequences would be advantageous. It can be envisaged that an increase in the stability of the dimeric form of p21 Max by the double mutation could result in an increased stability of its specific DNA complex. In order to address the impact of the stabilization of p21 Max VL on the stability of the respective E-Box/DNA complexes, we recorded the temperature-induced denaturations monitored by CD of p21 Max and p21 Max VL in the presence of an E-box dsDNA at a protein/DNA ratio of 1:1 and 32  $\mu\text{M}$  (Figure 9). At 20°C, the  $K_D$  of both p21 Max and p21 Max VL were below  $10^{-9}$  indicating that the population of dimeric species at 20 °C and 32  $\mu\text{M}$  was 100% in both cases (Supplementary Material). As can be seen in Figure 9, the two curves suggest a two-state process in accord with temperature-induced DNA dissociation followed by the coupled dissociation/unfolding of p21 Max. The melting curve for the E-Box dsDNA has been reported elsewhere and has been subtracted from the raw denaturation curves. The  $T^\circ$  of E-Box dsDNA is 75 °C, a value above both apparent denaturation  $T^\circ$  for the p21 Max (42 °C) and p21 Max VL (67 °C). As reported previously by several groups, the  $\alpha$ -helical content of the dimeric b-HLH-LZ of Max is increased in the presence of E-Box dsDNA. This improvement was attributed to the folding/stabilization of the b-region by DNA (13, 28). The  $[\theta]$  at 222 nm of both p21 Max and p21 Max VL are increased in the presence of E-Box dsDNA, by 3003 and 3698  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ , respectively as it can be seen in far-UV CD spectra at 32  $\mu\text{M}$ , pH 6.8 and 20 °C (Figure 10). The gain in  $[\theta]$  at 222 nm of 3003 and 3698  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  correspond to the folding of 12 to 14 residues, respectively, into  $\alpha$ -helical structure, a value in accord with the folding/stabilization of the b-region induced by DNA binding. As judged from the relative increase in the apparent  $T^\circ$ , it can also be observed that DNA binding results



in a larger gain in stability for p21 Max ( $\Delta T^\circ=12^\circ\text{C}$ ) than for p21 Max VL ( $\Delta T^\circ=7^\circ\text{C}$ ). This can be rationalized by a cooperative effect of DNA that is more prominent in the case of p21 Max. Indeed, we have shown elsewhere that the double mutation in the LZ had stabilized the HLH domain of Max\*VL by a cooperative effect (13). In other words, if the probability of having the LZ domain folded was increased, this would in turn increase the probability of finding the HLH domain folded, hence the cooperative stabilization. A similar effect can be expected on the HLH domain from the stabilization of the b-region. However, since the HLH domain of p21 Max VL is already stabilized by the double mutation, the cooperative stabilization coming from DNA is expected to be less important than in the case of p21 Max.

Finally, as can be observed in Figure 9, all of p21 Max/E-Box dsDNA complex is denatured at  $55^\circ\text{C}$ , while the p21 Max VL/E-Box dsDNA complex remains populated. The apparent increased stability of the protein/dsDNA interactions can therefore be linked to the higher probability of p21 Max VL of forming a dimer at higher temperature. Indeed, at  $55^\circ\text{C}$  no dimeric p21 Max exists at  $32\ \mu\text{M}$  while most of the p21 Max VL is still dimeric (supplementary material). Thus, the *in vivo* population of p21 Max/E-Box dsDNA complex could be controlled either by its nuclear concentration or by the stability of its LZ domain.

## Discussion

Based on CD, NMR, sedimentation equilibrium and velocity analytical ultracentrifugation we show that in absence of DNA, the HLH domain of p21 Max is stably folded but that its LZ domain is most likely undergoing a microscopic folding-unfolding transition in its dimeric state (Figure 11, vertical equilibrium on the left). The existence of the folding-unfolding transition of the LZ domain is further warranted by: 1- a dramatic increase in stability, 2- a raise in  $\alpha$ -helical content attaining that expected for a folded HLH-LZ and 3- a concomitant elevation of the frictional ratio (increase in asymmetry) of the dimeric p21 Max VL construct (Figure 11). p21 Max VL was obtained by the N69V and H72L double mutation in the LZ domain of p21 Max. This demonstrates that the LZ domain of the p21 Max dimer is only transiently folded and further confirms that Asn69 and His72 are a key residues in the destabilization of p21 Max, an integral part of the mechanism of specific heterodimerization (29-31).

Furthermore, our results demonstrate that neither the N-terminal nor the C-terminal domains are stably folded in absence or in presence of DNA (23). This clearly reveals that these regions do not structurally or directly contribute to homodimer formation or DNA binding. While it is known that a NLS is located in the C-terminal domain (35) and that phosphorylation sites are present in the N-terminal domain (36), our results raise the question about the existence of any structural function for the N- and C-terminal regions, which accounts for almost half of the protein. However, it has been shown that Max interacts with other proteins such as SMAD (37), Mnt (38), and Mga (39). It is possible that these regions of Max could undergo transient folding that may perhaps be stabilized

by these proteins and play a role in the specificity protein-protein interactions. This remains to be clarified.

We have determined an apparent  $K_D$  (37°C) of  $7.2 \cdot 10^{-6}$  for p21 Max. To our knowledge, this is the first estimate of the  $K_D$  for the complete p21 gene product of Max. This value is markedly lower than the  $1-10 \cdot 10^{-5}$  values obtained for the isolated b-HLH-LZ domain at similar pH values (13, 26). Interestingly, we demonstrate here that the b-HLH-LZ is destabilized by electrostatic repulsions. These repulsions are absent in p21 Max. Indeed the thermodynamical stability of p21 Max is insensitive to ionic strength, while that of the b-HLH-LZ is highly sensitive. Interestingly, the N- terminus is very acidic and its presence is shown to reduce the positive and destabilizing electrostatic potential shown to exist at the interface of the HLH in absence of DNA (20). Therefore, the N-terminus could have an indirect or structurally passive role that could consist in reducing or masking these electrostatic repulsions present in the b-HLH-LZ in p21 Max and decrease its  $K_D$  in a physiologically functional range. It is still unclear whether Max homodimer play a role in transcription *in vivo* other than being the obligate partner of the Myc and Mad proteins. However, evidence suggests that when overexpressed in cells, the Max homodimer can compete with c-Myc/Max heterodimer and reversibly repress transcription (11). However, the p21 Max homodimer can only play a role if it dimerizes *in vivo*. This has not been established before and will depend both on its  $K_D$  and its free concentration in the nucleus. While the nuclear concentration of Max has not been reported under any cellular state, it is estimated that 29,000 copies of c-Myc are present in the nucleus of proliferating fibroblasts (40). Assuming a volume of  $5 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^3$  for the

nucleus (41), the concentration of c-Myc in these cells is in the order of  $1.5 \cdot 10^{-7}$  M. Since p21 Max preferentially forms a heterodimer with c-Myc, its concentration in growing and proliferating cells must be, at the least, of the same order of magnitude. Given the observed  $K_D$  reported here ( $7 \times 10^{-6}$ ), it could be estimated that when c-Myc is down-regulated, the population of dimeric p21 Max, ready to bind DNA, should be in the order of 10 %. The rest of the monomeric population would be poised to heterodimerize. It noteworthy to remind that, when proliferating fibroblasts are treated with TGF- $\beta$ , the level of c-Myc bound to Max decreases and the levels of Max and Mad proteins concomitantly increase (12). Moreover, after treatment with TGF- $\beta$ , the amount of free Max significantly increases, possibly by a factor of 10 (12). Coupled to a down-regulation of c-Myc, this could lead to a transient increase in the population of dimeric Max, from 10 to 40 % assuming an increase in concentration from  $1.5 \cdot 10^{-7}$  to  $1.5 \cdot 10^{-6}$  M. Given that DNA binding will give rise to a mass action, one can safely assume that E-box sites originally occupied by the c-Myc-Max heterodimer could be transiently bound by the p21 Max dimer. While Max has not been demonstrated to interact with any co-activators or co-repressors, our results suggest that it could nevertheless transiently and reversibly represses the transcription of c-Myc target genes during the response to TGF- $\beta$ . If the presence of TGF- $\beta$  is maintained, the level of Mad will increase and most likely lead to heterodimerization between Mad and Max and the replacement of the p21 Max dimer on the E-box sites permanent repression of transcription by closure of the chromatin in the vicinity of the promoters. These estimates also depend on the nuclear concentrations of proteins of the Mad family and the relative affinities of these proteins

for Max compared to the thermodynamical stability of Max homodimers. This still has to be characterized.

Finally, the improved thermodynamical stability of p21 Max VL construct over p21 Max that promotes the formation of significantly more E-Box complexes (Figure 11) at physiological concentrations could reduce efficiently the growth and proliferation of cancer cells that overexpress c-Myc. In this regard, p21 Max could have interesting applications in the study of cancer biology.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank Robert Eisenman for kindly providing plasmid pVZ1 containing the protein p21 Max. We are also grateful to the Queen's University Protein Function Discovery Facility for use of the AUC. Authors want also thank Dr. Luc Tremblay for the expert NMR maintenance and for his help during the data acquisition.

### **References**

- 1- Blackwood, E. M., and Eisenman, R. N. (1991) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc, *Science* 251, 1211-1217.
- 2- Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., and Eisenman, R. N. (2000) The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 653-699.
- 3- Eberhardy, S. R., and Farnham, P. J. (2002) Myc recruits P-TEFb to mediate the final step in the transcriptional activation of the cad promoter, *J. Biol. Chem.* 277, 40156-40162.
- 4- Barsyte-Lovejoy, D., Mao, D. YL., and Penn, L. Z. (2004) c-Myc represses the proximal promoters of GADD45a and GADD153 by a post-RNA polymerase II recruitment mechanism, *Oncogene* 23, 3481-3486.
- 5- Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hanel, F & Eilers, M. (1997) An alternative pathway for gene regulation by Myc, *EMBO J* 16, 5672-5686.
- 6- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Barket, J., Massague, J., Hanel, F., and Eilers, M. (2001) Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1, *Nat. Cell Biol.* 3, 392-399.
- 7- Wanzel, M., Herold, S., and Eilers, M. (2003) Transcriptional repression by Myc, *TRENDS in Cell Biol.* 13, 146-150.
- 8- Cowley, S. M., Kang, S. K., Frangioni, J. V., Yada, J. J., DeGrand, A. M., Radhakrishnan, I., and Eisenman, R.N. (2004) Functional analysis of the Mad1-mSin3A

repressor-corepressor interaction reveals determinants of specificity, affinity, and transcriptional response, *Mol. Cell. Biol.* 24, 2698-2709.

9- Laherty, C. D., Yang, W.M., Sun, J. M., Davie, J. R., Seto, E., and Eisenman, R. N. (1997) Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression, *Cell* 89, 349-356.

10- Koskinen, P. J., Vastrik, I., Makela, T. P., Eisenman, R. N., and Alitalo, K. (1994) Max activity is affected by phosphorylation at two NH2-terminal sites, *Cell Growth Differ.* 5, 313-320.

11- Gu, W., Cechova, K., Tassi, V., and Dalla-Favera, R. (1993) Opposite regulation of gene transcription and cell proliferation by c-Myc and Max, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2935-2939.

12- Siegel, P. M., Shu, W., and Massague, J. (2003) Mad upregulation and Id2 repression accompany transforming growth factor (TGF)-beta-mediated epithelial cell growth suppression, *J. Biol. Chem.* 278, 35444-35450.

13- Naud, J. F., Gagnon, F., Wellinger, R., Chabot, B., and Lavigne, P. (2003) Improving the thermodynamic stability of the leucine zipper of max increases the stability of its b-HLH-LZ:E-box complex, *J. Mol. Biol.* 326, 1577-1595.

14- Chen, Y. H., Yang, J. T., and Chau, K. H. (1974) Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism, *Biochemistry* 13, 3350-3359.

- 15- Kay L., Keifer, P., and Saarinen T. (1992) Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity, *JACS* *114*, 10663-10665.
- 16- Weigelt, J., (1998) Single Scan, Sensitivity- and Gradient-Enhanced TROSY for Multidimensional NMR Experiments, *JACS* *120*, 10778-10779.
- 17- Delaglio, F., Grzesieks, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing based on Unix pipes, *J. Biomol. NMR* *6*, 277-293.
- 18- Johnson, B. A. and Blevins, R. A. (1994) NMRView: a computer program for the visualization and analysis of NMR data, *J. Biomol. NMR* *4*, 603-614.
- 19- Schuck, P., Perugini, M. A., Gonzales, N. R., Howlett, G. J. & Schubert, D. (2002) Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems, *Biophys J* *82*, 1096-111.
- 20- Sauve, S., Tremblay, L., and Lavigne P. (2004), The NMR solution structure of a mutant of the Max b/HLH/LZ free of DNA: insights into the specific and reversible DNA binding mechanism of dimeric transcription factors, *J. Mol. Biol.* *342*, 813-32.
- 21- Nicholls, A., Sharp, K., and Honig, B. (1991) Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons, *Proteins* *11*, 281-296.
- 22- Carson, M. (1997) Ribbons, *Methods Enzymol.* *277*, 493-505.



- 23- Brownlie, P., Ceska, T. A., Lamers, M., Romier, C., Stier, G., Teo, H., and Suck, D. (1997) The crystal structure of an intact human Max-DNA complex: new insights into mechanisms of transcriptional control, *Curr. Biol.* 5, 509-520.
- 24- Ferre-D'Amare, A. R., Prendergast, G. C., Ziff, E. B., and Burley, S. K. (1993) Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain, *Nature* 363, 38-44.
- 25- Cohen, S. L., Ferre-d'Amare, A. R., Burley, S. K., and Chait, B. T. (1995) Probing the solution structure of the DNA-binding protein Max by a combination of proteolysis and mass spectrometry, *Protein Science* 4, 1088-1099.
- 26- Fieber, W., Schneider, M. L., Matt, T., Krautler, B., Konrat, R., and Bister, K. (2001) Structure, function, and dynamics of the dimerization and DNA-binding domain of oncogenic transcription factor v-Myc, *J. Mol. Biol.* 307, 1395-1410.
- 27- Krylov, D., Kasai, K., Echlin, D. R., Taparowsky, E. J., Arnheiter, H., and Vinson, C. (1997) A general method to design dominant negatives to B-HLHZip proteins that abolish DNA binding, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 12274-12279.
- 28- Horiuchi, M., Kurihara, Y., Katahira, M., Maeda, T., Saito, T., and Uesugi, S. (1997) Dimerization and DNA binding facilitate alpha-helix formation of Max in solution, *J. Biochem.* 122, 711-716.
- 29- Lavigne, P., Kondejewski, L. H., Houston, M. E., Jr, Sonnichsen, F. D., Lix, B., Sykes, B.D., Hodges R.S., and Kay C.M. (1995) Preferential heterodimeric parallel coiled-coil formation by synthetic Max and c-Myc leucine zippers: a description of

putative electrostatic interactions responsible for the specificity of hétérodimérisation, *J. Mol. Biol.* 254, 505-520.

30- Muhle-Goll, C., Nilges, M., and Pastore, A. (1995) The leucine zippers of the HLH-LZ proteins Max and c-Myc preferentially form heterodimers, *Biochemistry* 34, 13554-13564.

31- Lavigne, P., Crump, M. P., Gagne, S. M., Hodges, R. S., Kay, C. M., and Sykes, B. D. (1998) Insights into the mechanism of heterodimerization from the <sup>1</sup>H-NMR solution structure of the c-Myc-Max heterodimeric leucine zipper, *J. Mol. Biol.* 281, 165-181.

32- Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., and Wuthrich, K. (1997) Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12366-12371.

33- Palmer, A. G. III, Kroenke, C. D., and Loria, J.P. (2001) Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules, *Methods Enzymol.* 339, 204-38

34- Palmer, A. G. III (2001) Nmr probes of molecular dynamics: overview and comparison with other techniques, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 129-155

35- Kato, G.J., Lee, W. M., Chen, L. L., and Dang, C. V. (1992) Max: functional domains and interaction with c-Myc, *Genes & Dev.* 6, 81-92.

36- Bousset, K., Henriksson, M., Luscher-Firzlaff, J. M., Litchfield, D.W., and Luscher B. (1993) Identification of casein kinase II phosphorylation sites in Max: effects on

DNA-binding kinetics of Max homo- and Myc/Max heterodimers, *Oncogene* 12, 3211-20.

37- Grinder, A. V., and Kerpola, T. (2003) Both Max and TFE3 cooperate with Smad proteins to bind the plasminogen activator inhibitor-1 promoter, but they have opposite effects on transcriptional activity, *J. Biol. Chem.* 278, 11227-36.

38- Hurlin, P. J., Queva, C., and Eisenman, R. N. (1997) Mnt, a novel Max-interacting protein is coexpressed with Myc in proliferating cells and mediates repression at Myc binding sites, *Genes Dev.* 11, 44-58.

39- Hurlin, P. J., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Eisenman, R. N. (1999) Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif, *EMBO J.* 18, 7019-28.

40- Rudolph, C., Adam, G., and Simm, A. (1999) Determination of copy number of c-Myc protein per cell by quantitative Western blotting, *Anal. Biochem.* 269, 66-71.

41- Nair, S. K., and Burley, S. K. (2003) X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors, *Cell* 112, 193-205.

Table 1

p21 Max		p21 Max VL	
$T_D^\circ$	41.6 °C	$T_I^\circ$	58.2 °C
		$T_D^\circ$	67.5 °C
$\Delta G_D$ (37°C)	7.30 kcal/mol	$\Delta G_I$ (37°C)	4.09 kcal/mol
		$\Delta G_D$ (37°C)	13.50 kcal/mol
$\Delta H_D$ (37°C)	83.15 kcal/mol	$\Delta H_I$ (37°C)	59.75 kcal/mol
		$\Delta H_D$ (37°C)	68.35 kcal/mol
$\Delta S_D$ (37°C)	0,244 kcal/mol·K	$\Delta S_I$ (37°C)	0,179 kcal/mol·K
		$\Delta S_D$ (37°C)	0.177 kcal/mol·K
$K_D$ (37°C)	$7.16 \cdot 10^{-6}$	$K_I$ (37°C)	$1.32 \cdot 10^{-3}$
		$K_D$ (37°C)	$3.09 \cdot 10^{-10}$

For p21 Max and p21 Max VL, thermodynamic parameters of unfolding are indicated by the letter D. Thermodynamic parameters for the intermediate state present during the unfolding of p21 Max VL are also shown (identified by the letter I).

**Table 1.** Thermodynamic parameters obtained from the fitting of the temperature-induced denaturation as described in experimental procedures.

Table 2

SE		SV		
Construct	$M_r$			$M_r$
(kDa)	(kDa)	$S$	$f/f_o$	(kDa)
WT				
(34.4)	39.5	2.33	1.5	30.5
VL				
(34.3)	34.9	2.24	1.69	34.1

Table 2. Molecular Masses and Hydrodynamics Properties of p21 Max and p21 Max VL.

See text for details.

### Figure Legend

**Figure 1.** p21 Max and p21 Max VL recombinant proteins. (a) Amino acid sequences alignment of p21 Max and p21 Max VL. Amino acid sequences represented in blue indicate the b-HLH-LZ domain of p21 Max and p21 Max VL and in black, its N- and C-terminal ends. (b) Ribbons diagram of the NMR structure of the b-HLH-LZ of Max VL (1R05.pdb) in absence of DNA<sup>19</sup>.

**Figure 2.** Far-UV CD spectra (a) and temperature-induced denaturation (b) of p21 Max. Spectra are presented in units of mean residue ellipticity ( $[\theta]$ ). The unfolding reaction was monitored by recording  $[\theta]$  at 222 nm as function of temperature. Denaturation was found to be fully reversible. Proteins samples were at a concentration of 32  $\mu$ M (monomer units) in 50 mM phosphate (pH 6.8), 100 mM KCl. The continuous line shows the best fit of the data with equation (1) (see Materials and Methods). The best-fit parameters are listed in Table 1.

**Figure 3.** Analysis of the oligomeric solution state of p21 Max and p21 Max VL by sedimentation equilibrium analysis. Panels (A) and (B) show the residual and absorbance

plots from the sedimentation equilibrium run of p21 Max and p21 Max VL. Open circles show the UV absorbance gradient in the centrifuge cell. The data were fitted to a monomer-dimer equilibrium and the solid line denotes the fitted curve calculated from three rotor speeds and multiple protein concentrations. As judged from the goodness of the fits, both p21 Max and p21 Max VL are dimeric. Residuals show the difference in the fitted and experimental values as a function of radial position.

**Figure 4.** Far-UV CD spectra (a) and temperature-induced denaturation (b) of p21 Max VL. Spectra are presented in units of mean residue ellipticity ( $[\theta]$ ). The unfolding reaction was monitored by recording  $[\theta]$  at 222 nm as function of temperature. Denaturation was found to be fully reversible. Proteins samples were at a concentration of 32  $\mu$ M (monomer units) in 50 mM phosphate (pH 6.8), 100 mM KCl. The continuous line shows the best fit of the data (*see details in experimental procedures*). The best-fit parameters are listed in Table 2.

**Figure 5.** NMR evidence that the HLH of the complete gene product is folded and that the LZ of p21 Max is undergoing a dynamical process. The up-field regions of the  $^1\text{H}$ -1D spectra of Max\*VL (a), p21 Max (b) and p21 Max VL (c) are displayed and the  $^1\text{H}$ -methyl resonances located in the folded HLH are labeled. The first increments of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-TROSY spectra of Max\*VL (d), p21 Max (e) and p21 Max VL (f) are depicted and the resonance of the backbone  $^1\text{HN}$  of K80, which serves as a probe for the folded LZ domain, is labeled.

**Figure 6.** Localization of the  $\alpha$ -helical secondary structure in the LZ and HLH domains for the complete gene product. Superimposition of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-TROSY spectra of Max\*VL (red) and p21 MaxVL (blue) suggests that the LZ and HLH of p21 Max VL are stably folded and  $\alpha$ -helical. Regions depicting many of the resonances belonging to the HLH (b) and the LZ (c) are enlarged and residues located in the different folded and  $\alpha$ -helical domains of Max\*VL are labeled.

**Figure 7.** The electrostatic potential interpolated at the molecular surface of Max\*VL (a) and a model of p21 Max (b). The blue and red colors represent positive and negative potential, respectively. The electrostatic potential maps were calculated using the Poisson-Boltzman equation solver included in the program Grasp<sup>17</sup> using the default parameters and interpolated at the molecular surface at the same level. Note the darker blue color (positive electrostatic potential) at the interface of the HLH of Max\*VL.

**Figure 8.** Temperature-induced denaturations of (empty symbols) b-HLH-LZ of Max and (fill symbols) p21 Max in 50 mM phosphate buffer (pH6.8) with concentration of KCl from 0 mM (circle), 50 mM (square), 100 mM (triangle) and 250 mM (diamond). For the b-HLH-LZ of Max, an additional denaturation in 50 mM phosphate buffer (pH6.8) with concentration of 500 mM KCl (reverse triangle) was done. All denaturations were done at protein concentration of 32  $\mu\text{M}$ .



**Figure 9.** Temperature-induced denaturations on p21 Max and p21 Max VL with (empty circles) and without (fill symbols) E-Box dsDNA. The protein and E-Box dsDNA are at concentration of 32  $\mu$ M (monomer units) and dissolved in 50 mM phosphate buffer (pH 6.8), 100 mM KCl.

**Figure 10.** Far-UV CD spectra of (a) p21 Max and (b) p21 Max VL with (empty circles) and without (fill circles) E-Box dsDNA. The proteins and E-Box dsDNA are at concentration of 32  $\mu$ M (monomer units) and dissolved in 50 mM phosphate buffer (pH 6.8), 100 mM KCl.

**Figure 11.** Microscopic folding-unfolding transition in the dimeric p21 Max and DNA binding. p21 Max is shown with its HLH domain folded and its LZ domain partially folded with both the N- and C-termini unstructured as suggested from CD, NMR and AUC. Transient folding of the LZ domain of p21 Max (first vertical equilibrium) is shown to be quenched by the stabilizing N69V, H72L double mutation. As described in the text this is supported by CD, NMR and AUC. The stabilization of the LZ improves the stability of the p21 Max/E-Box complex (lower equilibrium).

**Supplementary Material: thermodynamic p21 Max.** Thermodynamic parameters obtained from the simulation of the temperature-induced denaturations of p21 Max

(empty circles) and p21 Max VL (fill circles). Plots showing  $\Delta G$  vs. T (a),  $\Delta H$  vs. T (b) and  $T\Delta S$  vs. T (c).

**Supplementary Material: thermodynamic p21 Max VL.** Thermodynamic parameters obtained from the simulation of the temperature-induced denaturations of p21 Max (empty circles) and p21 Max VL (fill circles). Plots showing  $\Delta G$  vs. T (a),  $\Delta H$  vs. T (b) and  $T\Delta S$  vs. T (c).

**Supplementary Material: population.** Native (fill circles) and unfolded (empty circles) population of (a) p21 Max obtained from the fitting of the temperature-induced denaturations at protein concentration of 32  $\mu\text{M}$  in 50 mM phosphate (pH 6.8), 100 mM KCl. Native (fill circles), intermediate (empty diamond) and unfolded (empty circles) population of (a) p21 Max VL obtained from the fitting of the temperature-induced denaturations at protein concentration of 32  $\mu\text{M}$  in 50 mM phosphate (pH 6.8), 100 mM KCl. Details of simulation are explained in experimental procedures.

Figure 1

a)

			Basic Region	Helix 1	Loop	Helix 2	
<i>p21 Max</i>	1	MSDNDDIEVE	SDADKRAHHN	ALERKRRDHI	KDSFHSLRDS	VPSLQGEKAS	RAQILDKATE 60
<i>p21 Max VL</i>	1	MSDNDDIEVE	SDADKRAHHN	ALERKRRDHI	KDSFHSLRDS	VPSLQGEKAS	RAQILDKATE 60
			Leucine Zipper				
<i>p21 Max</i>	61	YIQYMRRKNH	THQODIDDLK	RQNALLEQOV	RALEKARSSA	QLQTNYPSSD	NSLYTNAKGS 120
<i>p21 Max VL</i>	61	YIQYMRRKVH	TLQODIDDLK	RQNALLEQOV	RALEKARSSA	QLQTNYPSSD	NSLYTNAKGS 120
<i>p21 Max</i>	121	TISAFDGGSD	SSSESEPEEP	QSRKKLRMEA	S	151	
<i>p21 Max VL</i>	121	TISAFDGGSD	SSSESEPEEP	QSRKKLRMEA	S	151	

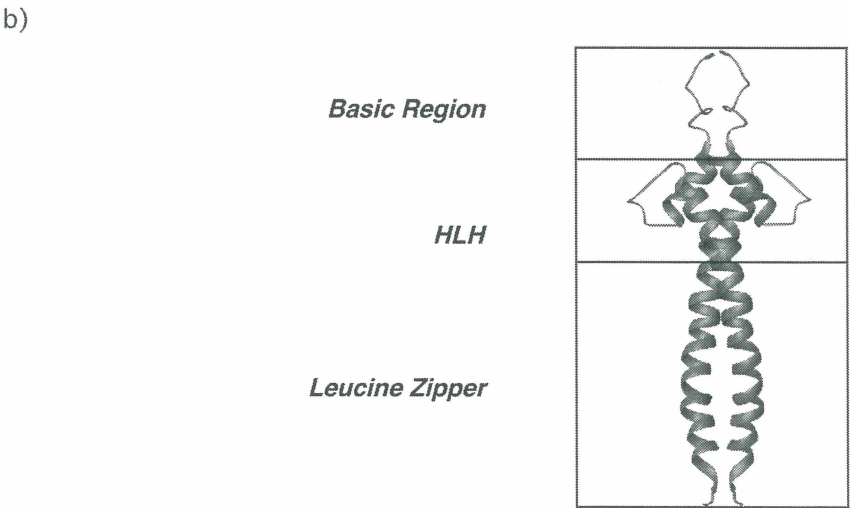
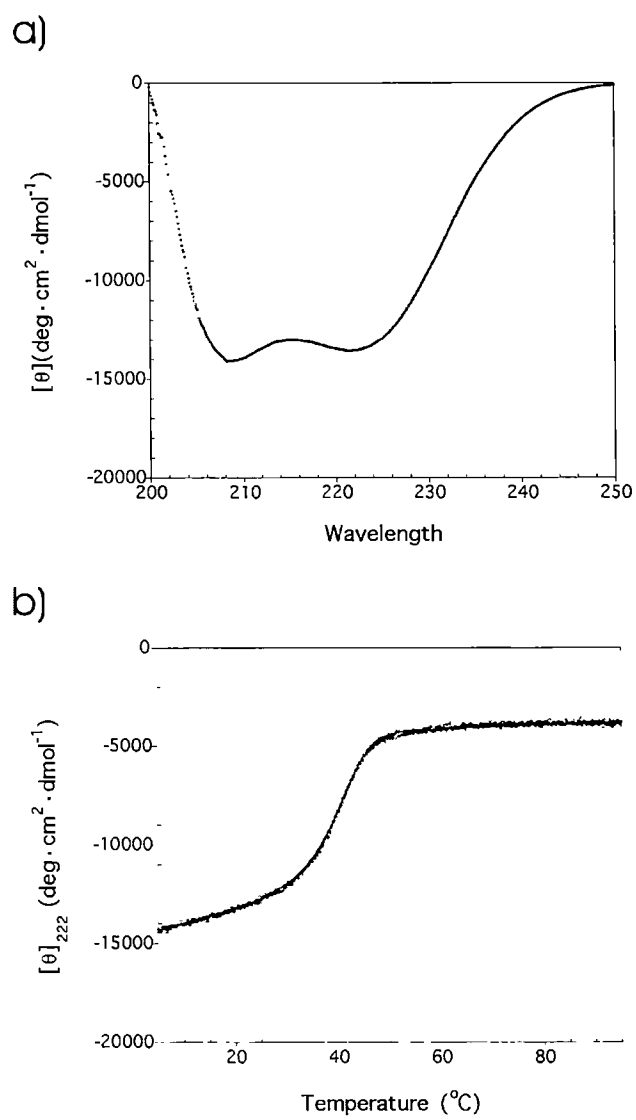


Figure 2



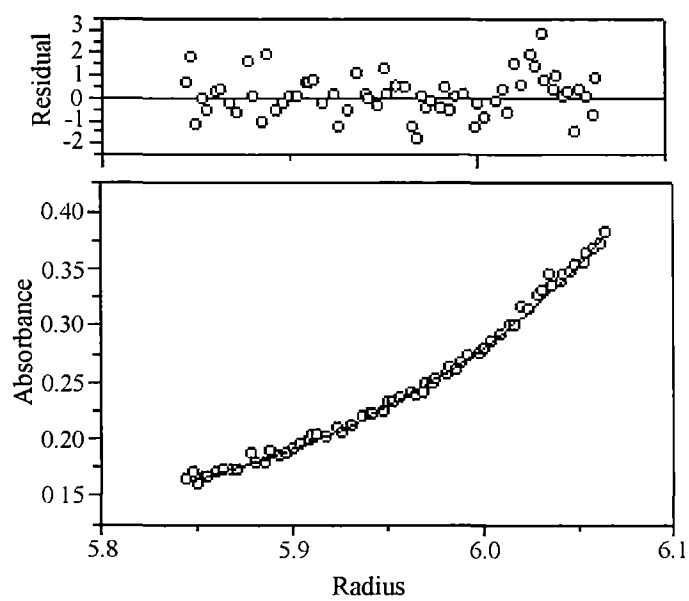
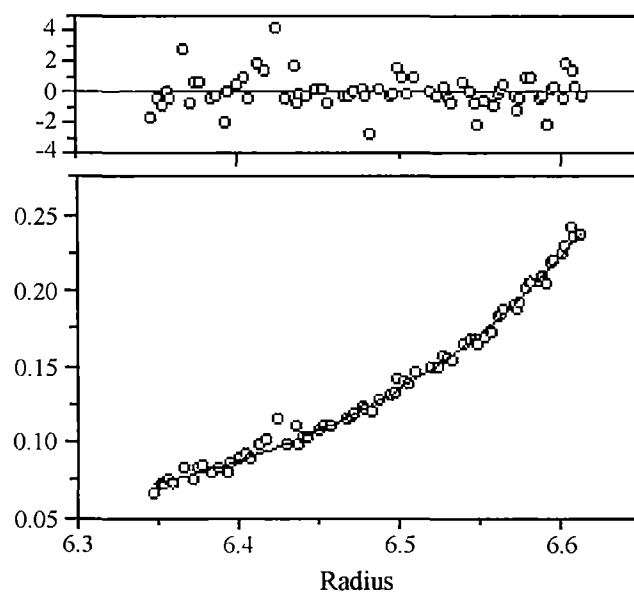
**Figure 3****a)****b)**

Figure 4

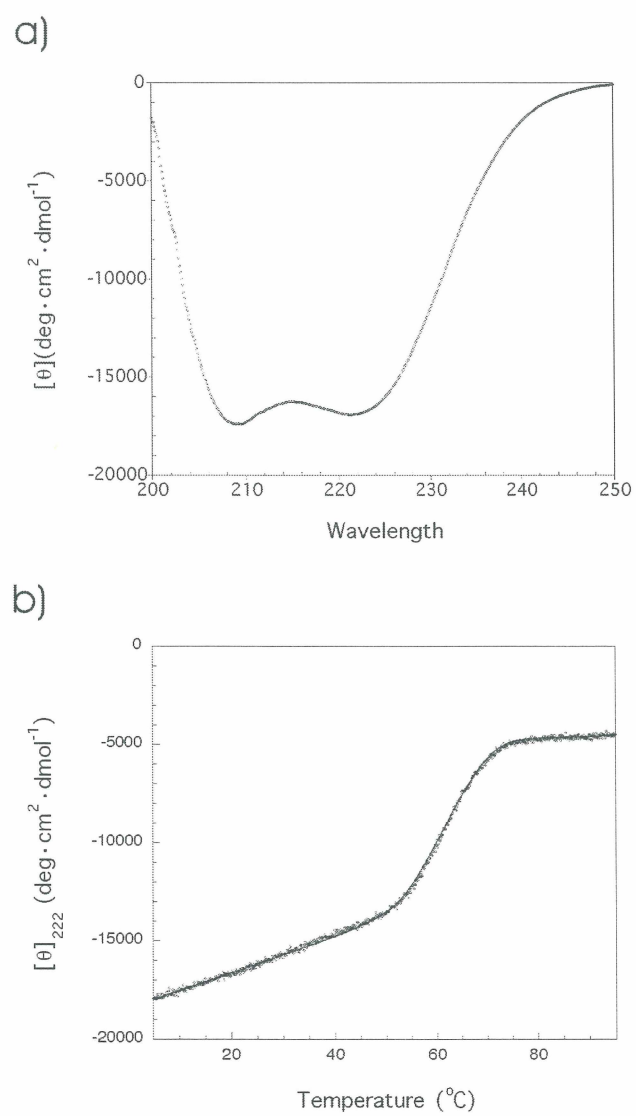


Figure 5

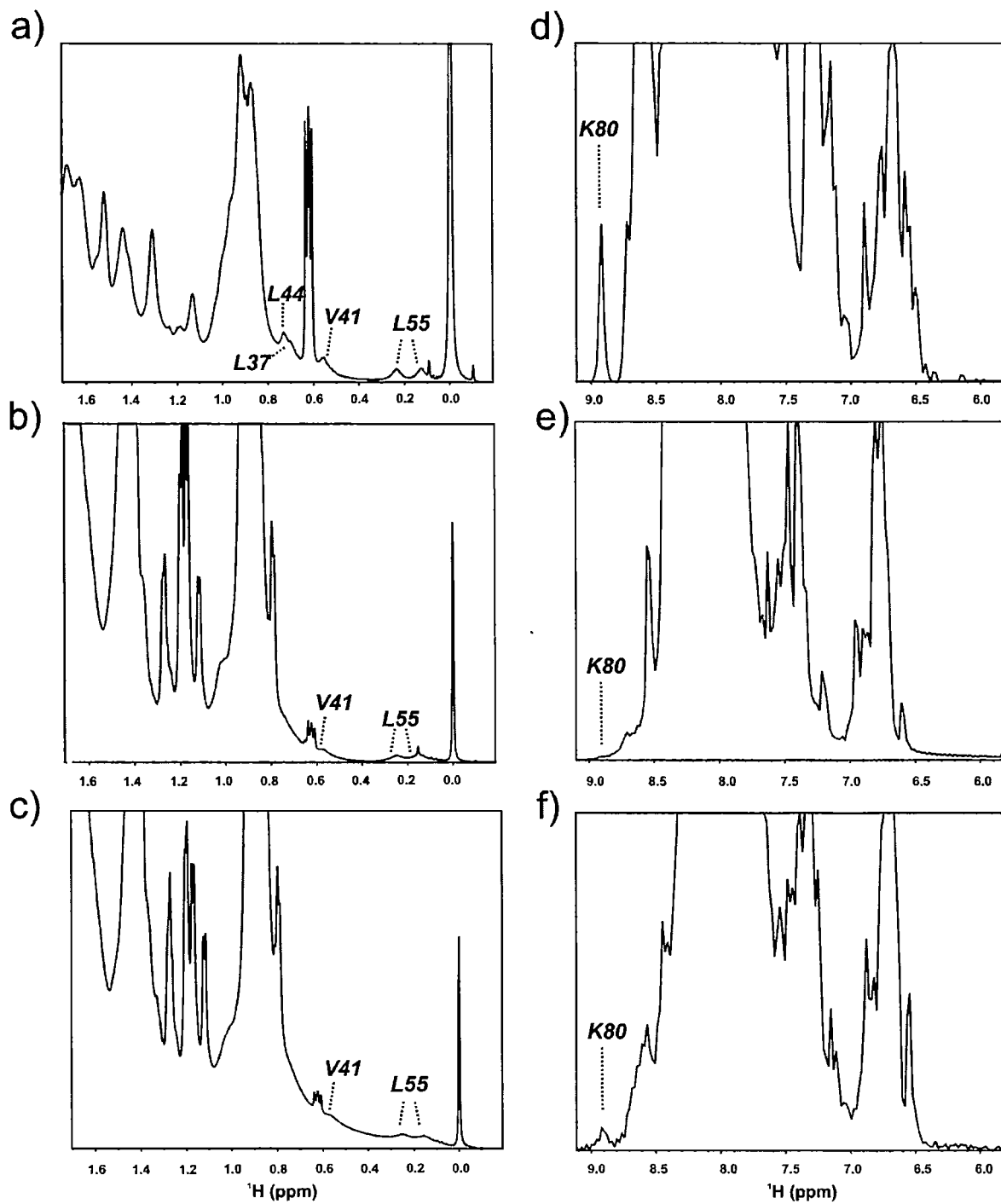
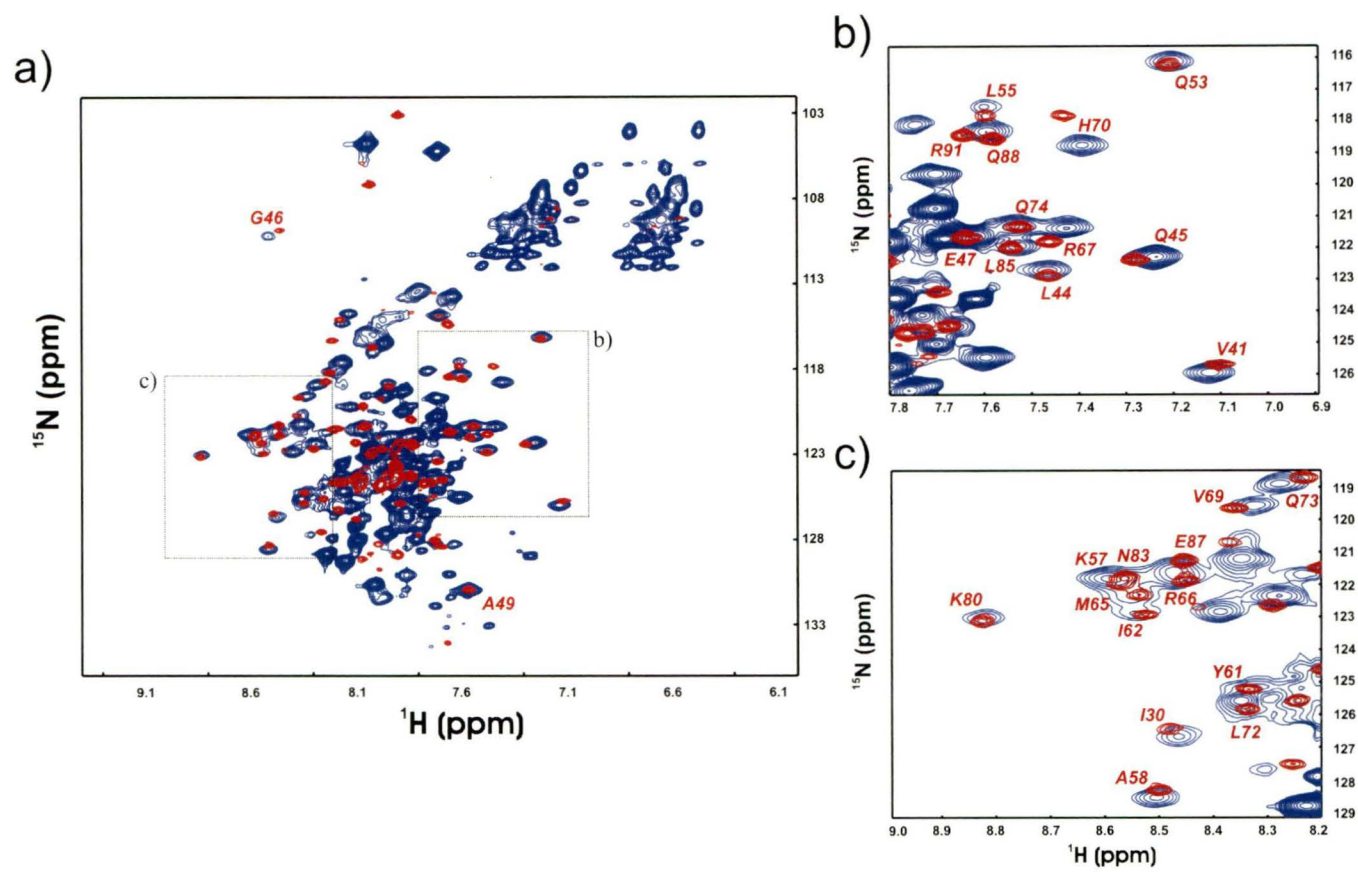


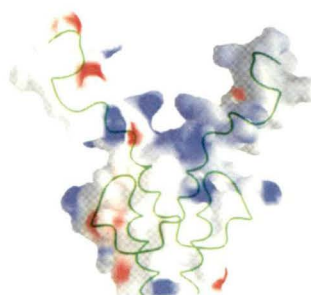
Figure 6





**Figure 7**

a)



b)

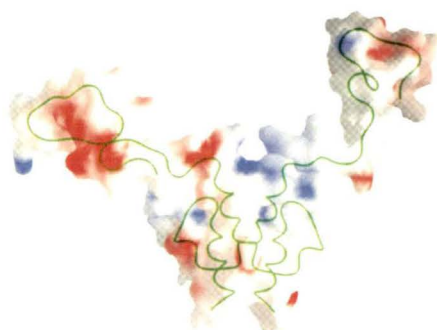


Figure 8

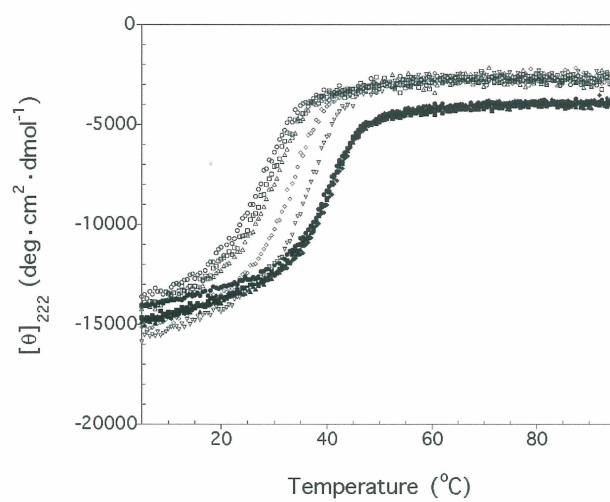


Figure 9

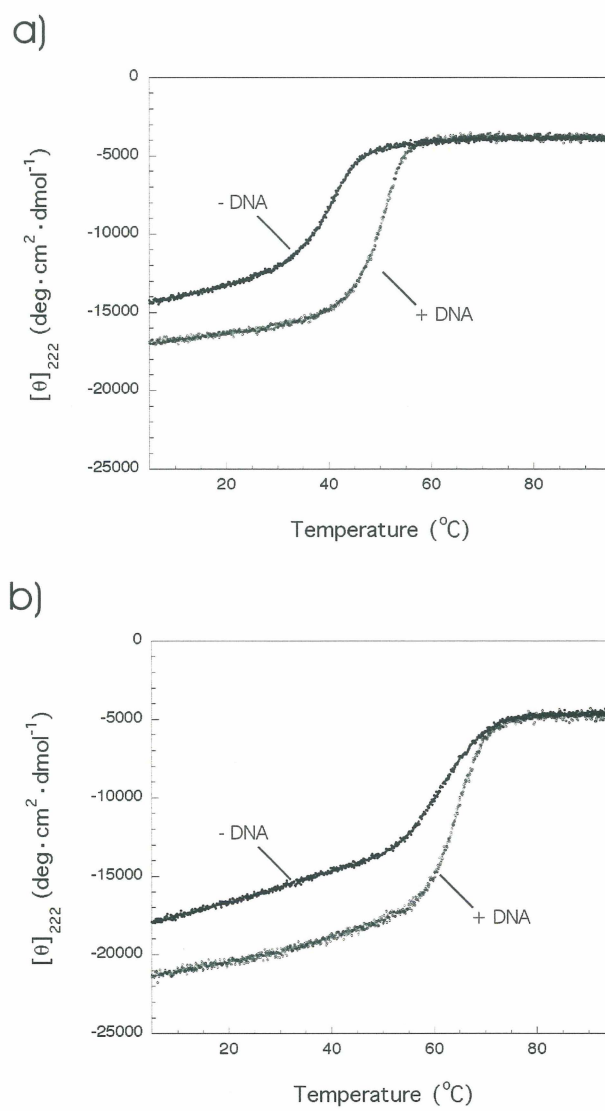
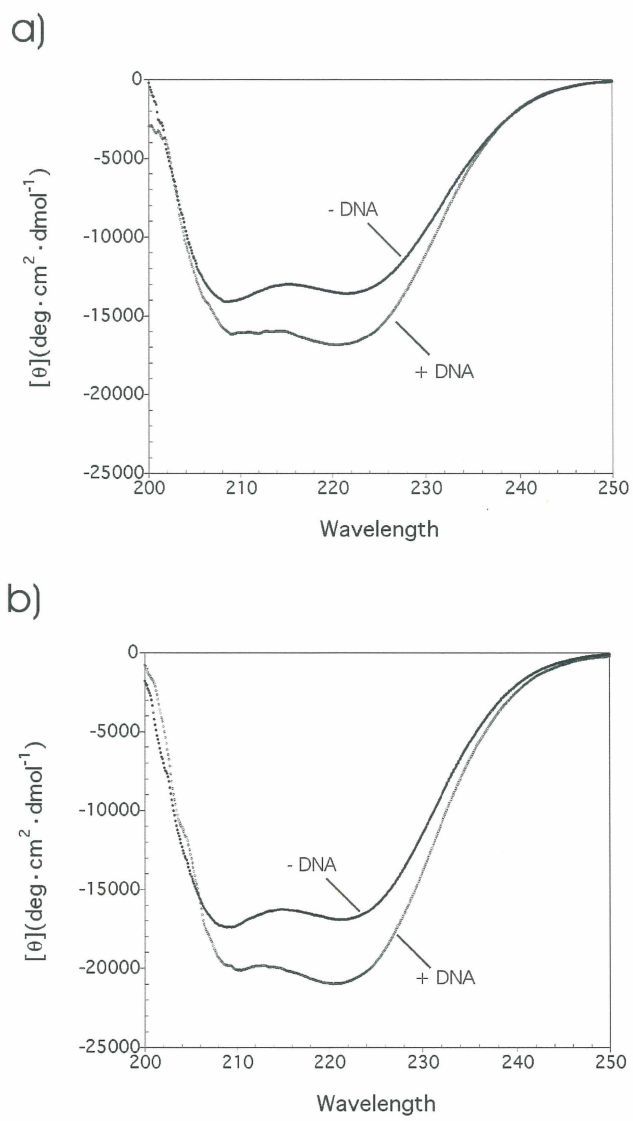
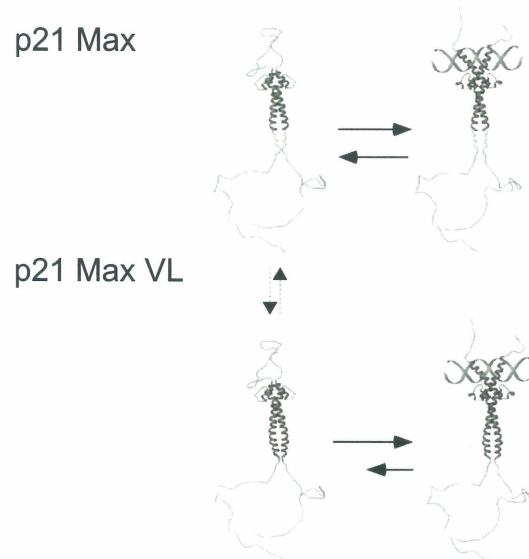
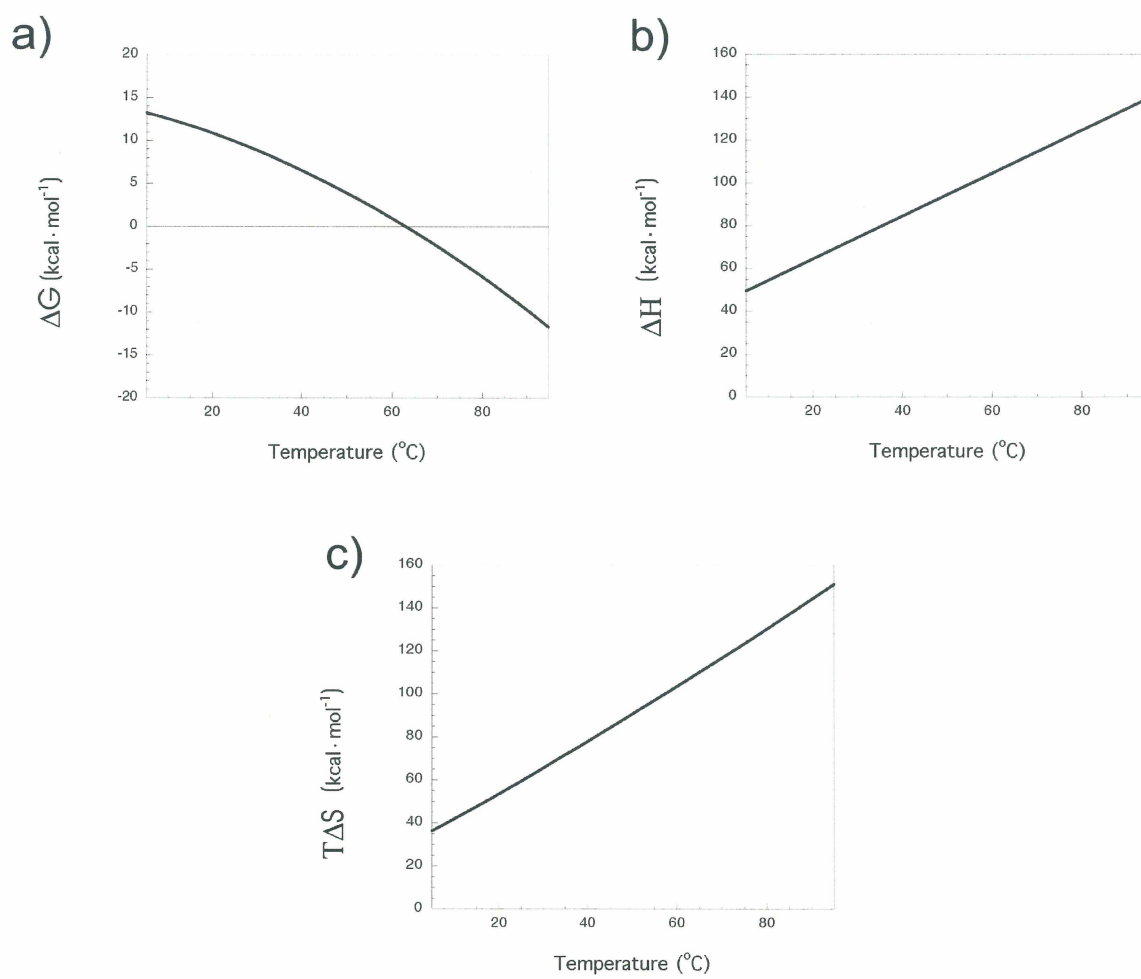


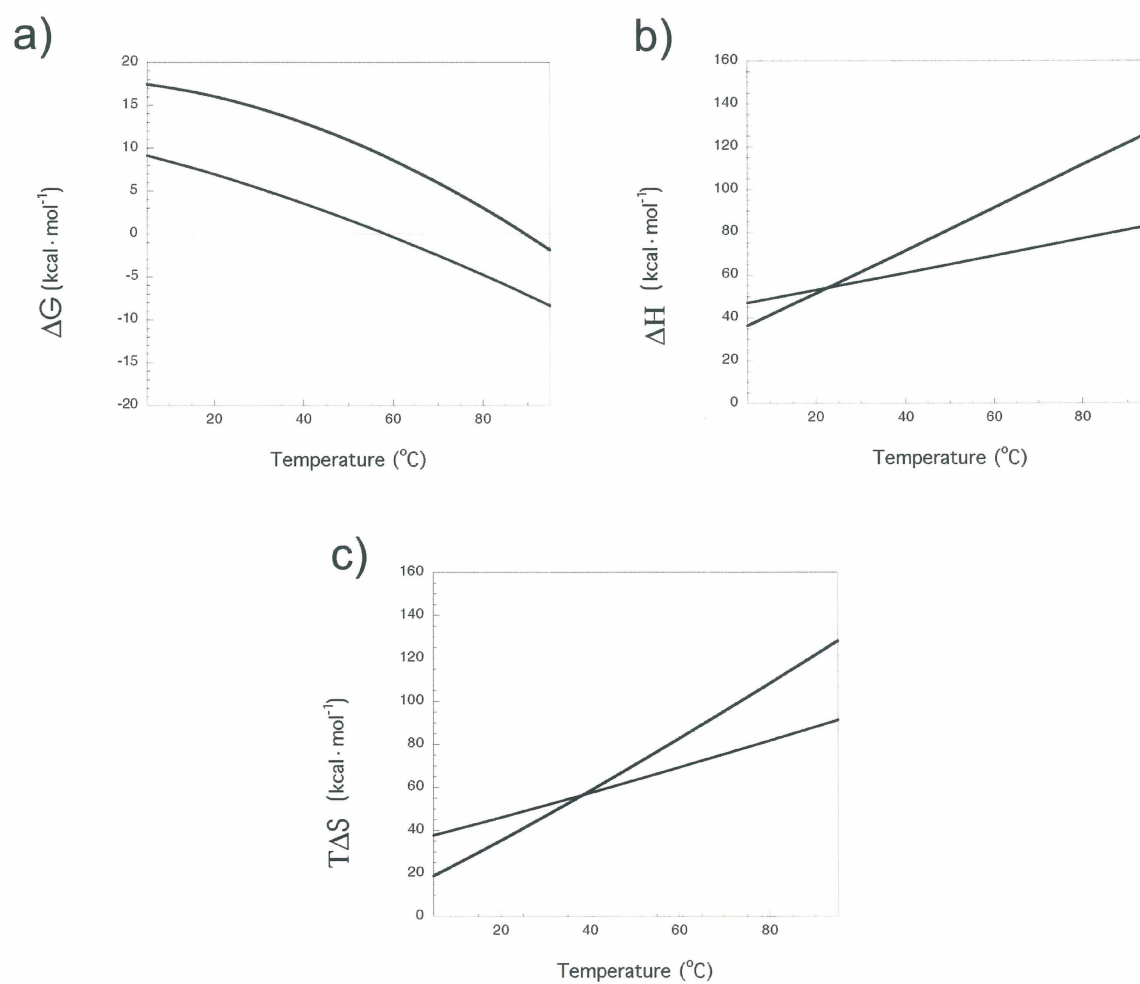
Figure 10



**Figure 11**

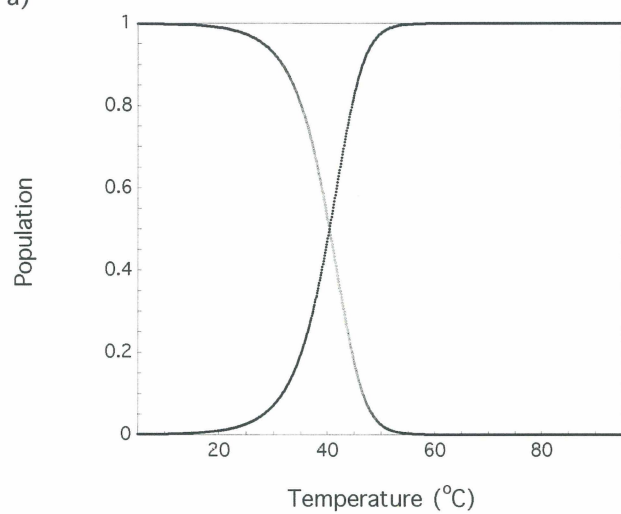
**Supplementary Material: thermodynamical characterization of p21 Max**

## Supplementary Material: thermodynamic p21 Max VL

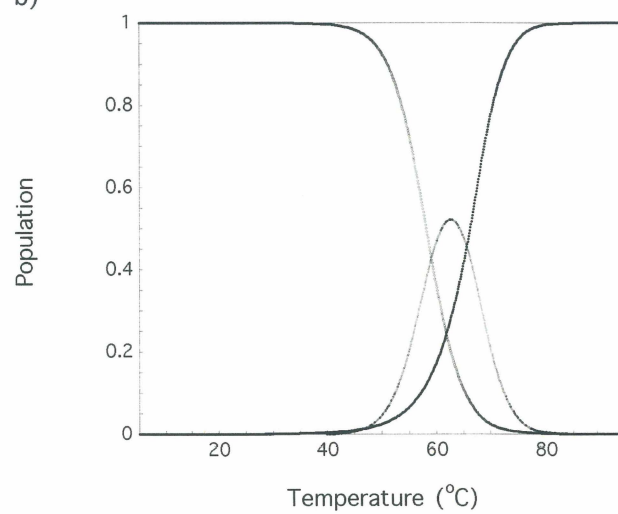


**Supplementary Material: population**

a)

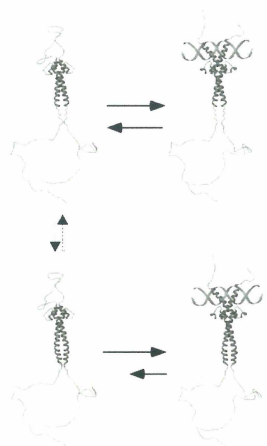


b)





**For Table of Contents Use Only**



Structural and Thermodynamical Characterization of the Complete p21 Gene Product of  
Max

Jean-François Naud, François-Olivier McDuff, Simon Sauvé, Martin Montagne, Bradley  
A. Webb, Steven P. Smith., Benoit Chabot and Pierre Lavigne

### **3.3 Inhibition spécifique de l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère c-Myc/Max sur le promoteur de hTERT: comparaison entre l'effet de la surexpression de Max WT et d'un mutant thermostable.**

Dans cette dernière section, l'effet de la surexpression de Max sur le promoteur d'un gène cible de c-Myc sera analysé. Selon notre hypothèse de départ, la surexpression de Max devrait inhiber l'activation de la transcription causée par l'hétérodimère c-Myc/Max. De plus, la stabilisation obtenue grâce à la double mutation à l'intérieur du LZ de Max VL devrait améliorer ce potentiel inhibiteur puisque la population homodimérique de Max VL est beaucoup plus grande que la celle de Max de type sauvage. Le promoteur du gène cible étudié lors de cette caractérisation *in vivo* est le promoteur de la sous-unité catalytique de la télomérase. Le promoteur de hTERT est utilisé ici seulement comme système modèle et il serait éventuellement intéressant de vérifier l'effet de la surexpression de Max et/ou de Max VL sur un plus grand nombre de gènes. La façon d'analyser un plus grand nombre de gènes est discuté dans la section perspectives de la présente thèse.

#### 3.3.1 Effet de la surexpression de Max WT et Max VL sur l'activité du promoteur de hTERT dans les cellules HCT-116 et HT-1080.

Les cellules HCT-116 proviennent de carcinome humain de colon. Celles-ci montrent une voie Wnt activée et un niveau élevé de c-Myc. Ces cellules possèdent une forte activité télomérase. Lors de la déplétion de c-Myc, ces cellules cessent de proliférer, augmentent

l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire *P21CIP1* et expriment des gènes marquant la différenciation cellulaire (VAN DE WETERING, 2002). Avec comme objectif de déterminer les conséquences physiologiques lors d'une surexpression de Max WT et de Max VL, nous avons utilisé un vecteur rapporteur contenant le promoteur de hTERT placé en amont de la séquence encodant la luciférase (pGL2-hTERT). Les résultats indiquent clairement que la co-transfection de pGL2-hTERT et de pCDNA3.1 mènent à une forte activité luciférase (figure 26). Les résultats sont exprimés en unités relatives d'activité luciférase (RLU). Cette unité de mesure est obtenue en rapportant l'activité luciférase de pGL2-hTERT à un vecteur rapporteur de base ne possédant aucun promoteur (pGL2) (figure 26). Ceci indique que les cellules HCT-116 peuvent activer la transcription du promoteur de hTERT et que la forte activité télomérase dans ces cellules pourrait provenir d'une forte activation de la transcription du gène *hTERT*. Les données montrent aussi que la surexpression de Max WT provoque une diminution de 61 % de l'activité luciférase après 48 heures. Lors de la surexpression de Max VL, nous notons également une diminution de l'activité luciférase, mais moins importante que celle observée avec Max WT (61% vs. 50 %). Il semble donc que Max WT soit un meilleur inhibiteur de la transcription que Max VL et ce même si Max VL possède une constante de dissociation plus faible. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat dont la possibilité que l'augmentation de la stabilité Max VL augmente l'affinité pour des sites de liaison non-spécifiques sur l'ADN. Dans le but de vérifier si l'inhibition observée est la conséquence du déplacement de l'hétérodimère c-Myc/Max par l'homodimère Max/Max sur les sites E-Box de pGL2-hTERT, nous avons procédé à la surexpression de Max WT ou de Max VL dans les cellules HT-1080. Ces cellules proviennent de

fibrosarcomes humains et contiennent elles aussi une activité télomérase. Cependant, la présence de c-Myc est indétectable dans ces cellules (ZONGBING *et al.*, 2002; PLATTNER *et al.*, 1999). Les résultats obtenus indiquent que l'effet stimulateur de c-Myc sur la transcription du promoteur de hTERT est observé seulement dans les cellules HCT-116 lorsque les concentrations cellulaires de c-Myc sont élevées suggérant que l'activité télomérase dans les cellules HT-1080 ne semble pas provenir d'une forte activation de la transcription du gène *hTERT*. Lors de la surexpression de Max WT ou de Max VL dans ces cellules, aucune inhibition de l'activité transcriptionnelle n'est observée nous suggérant que l'inhibition remarquée dans les cellules HCT-116 proviendrait du déplacement de l'hétérodimère c-Myc/Max.

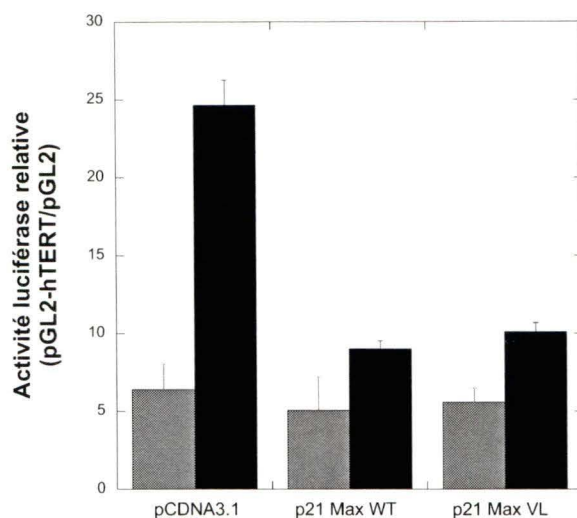


Figure 26 : Essais luciférase sur le promoteur hTERT. Les cellules HCT-116 (colonnes noires) ont été co-transfectées de façon transitoire avec 1  $\mu$ g de pGL2 contenant le promoteur de hTERT et 1  $\mu$ g de vecteur pCDNA3.1 ou pCDNA3.1 contenant l'insert de p21 Max WT ou de p21 Max VL. L'activité luciférase est rapportée sur l'activité luciférase obtenue avec le vecteur pGL2 ne contenant aucun promoteur (pGL2). La même expérience a été réalisée dans les cellules HT-1080 (colonnes grises). Les essais luciférase ont été effectués 48 heures post-transfection.

Afin de vérifier si la différence d'inhibition n'est pas due à une mauvaise expression de l'une des protéines, l'expression de Max WT et de Max VL dans les cellules HCT-116 a été analysée par immunobuvardage de type western à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre Max. Pour réaliser cette expérience, deux concentrations de plasmide ont été utilisées lors de la transfection. La spécificité de l'anticorps est confirmée par la transfection du vecteur pCDNA3.1 qui s'accompagne d'une absence de détection de protéine (figure 27). Par contre, lorsque les plasmides contenant Max WT ou Max VL sont transfectés, la détection de nos protéines recombinantes est constatée à 25 kDa, ce qui est plus élevé que le poids théorique de la protéine endogène puisque nos protéines recombinantes possèdent une étiquette HA. Le niveau d'expression des deux protéines est le même et l'utilisation d'une quantité moindre de plasmides résulte en une plus faible expression des protéines. Une observation surprenante ici est l'absence de détection de la protéine Max endogène suggérant que l'expression de celle-ci est très faible dans les cellules HCT-116. Puisque la surexpression de Max WT et Max VL dans les cellules HCT-116 diminue l'activité luciférase de notre vecteur rapporteur, nous avons voulu déterminer si cette diminution était due à une dégradation cellulaire de c-Myc dans ces cellules. Pour vérifier cette hypothèse, les extraits cellulaires qui ont servi lors de l'analyse du niveau d'expression de Max WT et Max VL ont été utilisés pour analyser par immunobuvardage le niveau de c-Myc. Les résultats indiquent qu'il n'y a pas de dégradation de c-Myc suite à la transfection de Max WT et Max VL (figure 27). Par contre, il est possible que la diminution de la quantité de c-Myc dans les cellules transfectées soit masquée par le c-Myc provenant des cellules non-transfectées.

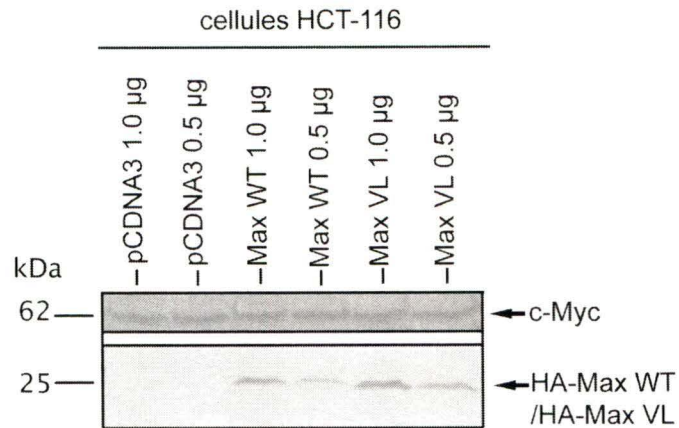


Figure 27 : Immunobuvardage de type western de c-Myc et Max dans les cellules HCT-116. L'anticorps monoclonal dirigé contre c-Myc détecte une protéine à 62 kDa dans les échantillons transfectés avec pCDNA3.1, Max WT et Max VL. Pour la détection de Max, un anticorps monoclonal spécifique a été utilisé. Celui-ci détecte les protéines recombinantes provenant des transfections avec les plasmides pCDNA3.1 contenant Max WT et Max VL. La taille des protéines détectées est légèrement supérieure à la taille de p21 et p22 Max due à la présence d'une étiquette HA située en N-terminal de nos protéines recombinantes. À noter l'absence de détection de la protéine Max endogène.

Puisque notre hypothèse de départ proposait que Max VL inhiberait plus efficacement la transcription que Max WT, nous avons vérifié l'inhibition de la transcription sur pGL2-hTERT en effectuant une cinétique d'induction pour examiner si l'écart entre l'inhibition apportée par Max WT et Max VL demeurerait semblable à différents temps post-transfection. La figure 28 représente les pourcentages d'inhibition observés à 24, 48 et 72 heures. Une plus forte inhibition de l'activité luciférase relative est observée 24 heures post-transfection, mais l'écart entre l'inhibition engendrée par la surexpression de Max WT et l'inhibition produite par la surexpression de Max VL demeure toujours similaire. Les résultats de cette expérience et ceux qui ont été obtenus lors de l'analyse du niveau d'expression des deux protéines confirment que Max VL est un moins bon inhibiteur de la transcription que Max WT sur le promoteur de hTERT. Puisque le taux de transfection des HCT-116 est très faible, il nous a été impossible de vérifier si la surexpression de Max pouvait conférer un nouveau phénotype aux cellules et si ce dernier était différent lors de l'expression de la protéine de type sauvage ou mutante. Par contre, plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence d'inhibition entre les deux protéines. Parmi celles-ci, notons la possibilité d'une différence de localisation cellulaire. Il a déjà été montré que la transduction d'un peptide correspondant à l'hélice 1 du HLH de c-Myc couplé à un peptide de pénétration pouvait inhiber l'expression de gènes cibles de c-Myc en prévenant la dimérisation avec Max et en retenant c-Myc au cytosol (BIDWELL et RAUCHER, 2005).



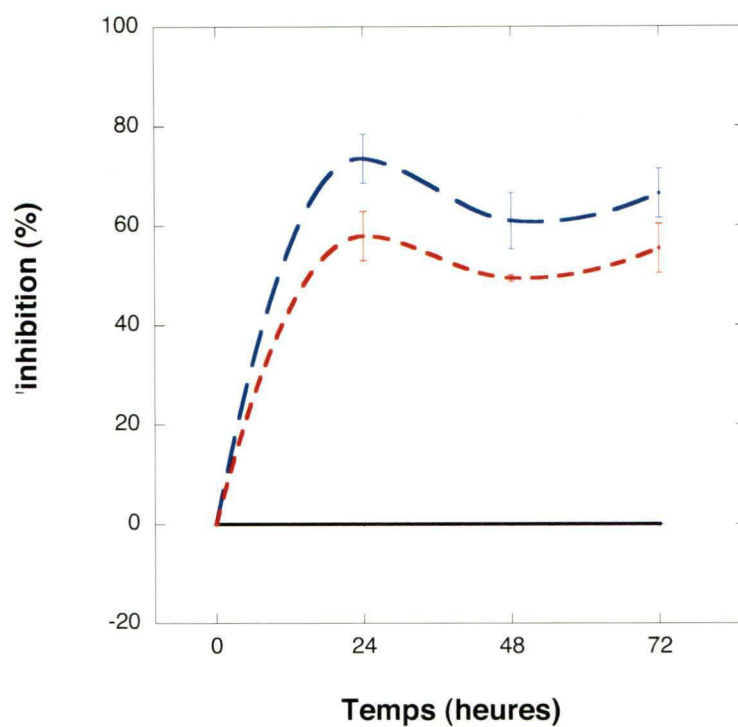


Figure 28 : Cinétique d'inhibition du promoteur de hTERT à différents temps post-transfection. Les pourcentages d'inhibition de l'activité du promoteur hTERT par Max WT (bleu) et Max VL (rouge) ont été comparés à 24 heures, 48 heures et 72 heures post-transfection

### 3.3.2 Localisation cellulaire de Max WT, Max VL et c-Myc dans les cellules HCT-116 et HT-1080.

Nous avons voulu vérifier la conséquence de la double mutation de Max VL sur sa localisation cellulaire et sur celle de c-Myc. Nous avons donc transfecté les cellules HCT-116 et HT-1080 avec Max WT ou Max VL. Puis, nous avons procédé à la détection de la surexpression Max WT ou VL par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps monoclonal couplé à l'Alexa-fluor 594 et dirigé contre l'étiquette HA pour discriminer la protéine recombinante de la protéine endogène. Pour localiser nos protéines recombinantes, nous avons coloré le noyau de nos cellules avec du Hoechst, un colorant fluorescent qui s'intercale dans l'ADN du noyau cellulaire. Finalement, nous avons procédé à la détection par immunofluorescence de c-Myc en utilisant un anticorps monoclonal couplé au FITC et dirigé contre c-Myc. La transfection avec le vecteur pCDNA3.1 (figure 29) confirme la spécificité de notre anticorps et les résultats préalablement obtenus par immunobuvardage de type western (figure 27). Par contre, lorsque le vecteur pCDNA3.1 contenant Max WT ou Max VL est transfecté, nous observons une forte expression de nos protéines recombinantes. Les deux protéines sont localisées au noyau puisque nous avons une co-localisation de l'immunofluorescence obtenue avec l'anti-HA et le Hoescht (figure 29). Donc, la différence d'inhibition observée entre Max WT et Max VL ne provient pas d'une mauvaise localisation cellulaire de Max VL. Par le fait même, il semble que l'augmentation de la stabilité de Max par les deux mutations n'affecte pas la localisation cellulaire de celui-ci. Bien que la localisation de Max VL soit identique à celle de Max WT, nous avons procédé à

l'immunofluorescence de c-Myc pour examiner l'hypothèse selon laquelle l'expression de Max VL pourrait affecter la localisation cellulaire de c-Myc. Les résultats obtenus (figure 29) indiquent que l'expression de Max WT ou de Max VL n'influence pas la localisation cellulaire de c-Myc puisque celle-ci est identique à la localisation observée dans les cellules transfectées avec pCDNA3.1. La détection de c-Myc montre aussi la présence d'agrégats. Ces agrégats ont déjà été observés précédemment et sont nucléolaires (ARABI *et al.*, 2005) ou localisés dans des corps nucléaires nommés « PML » (SMITH *et al.*, 2004).

Les mêmes expériences ont été effectuées avec les cellules HT-1080. Lors de la transfection avec le vecteur pCDNA3.1 contenant Max WT ou Max VL comme insert, nous observons une forte expression spécifique de nos protéines recombinantes (figure 30). L'expression des deux protéines est localisée au noyau puisque nous avons une co-localisation de l'immunofluorescence obtenue avec l'anti-HA et le Hoescht. Ces résultats sont identiques à ceux obtenus avec les cellules HCT-116. Nous avons procédé par la suite à la détection par immunofluorescence de c-Myc dans les cellules HT-1080. L'expression de ce dernier n'est pas détectée, en accord avec les observations précédentes (figure 30)(PLATTNER *et al.*, 1999).

### 3.3.3 Localisation de c-Myc et effet sur l'activité du promoteur de hTERT lors de la surexpression de c-Myc dans les cellules HT-1080.

Puisqu'il y a absence d'expression de c-Myc dans les cellules HT-1080, nous avons voulu reconstituer l'activité de l'hétérodimère c-Myc/Max en surexprimant c-Myc à l'intérieur de ces cellules. Pour réaliser cette expérience, nous avons co-transfecté un vecteur contenant c-Myc couplé à la EGFP (fourni par Dr. Antony Wright, Karolinska Institutet, Stockholm) et le vecteur pGL2-hTERT. Nous avons vérifié si la protéine, MycEGFP, s'exprimait correctement et était localisée au noyau. Puis, nous avons mesuré l'activité sur le promoteur de hTERT par essai luciférase. Les résultats obtenus par microscopie à fluorescence montrent que la transfection de MycEGFP donne une fluorescence intense située au noyau confirmant que MycEGFP est nucléaire (figure 31). Nous remarquons que cette fluorescence forme des agrégats. La formation de ces agrégats a été observée précédemment et dépend de la quantité de plasmide utilisée lors de la transfection. (ARABI *et al.*, 2005). La transfection d'un plasmide qui contient seulement la EGFP est utilisée comme contrôle et donne une fluorescence qui est distribuée dans toute la cellule (figure 31).

Par contre, la formation d'agrégats lors de l'expression de c-Myc ne semble pas affecter sa capacité à activer la transcription (ARABI *et al.*, 2005). D'ailleurs lors des essais luciférase, nous notons un accroissement de l'activité luciférase comparé à la transfection d'un plasmide contenant seulement EGFP (figure 32). L'activité transcriptionnelle à partir du promoteur hTERT lors de la transfection de MycEGFP est de deux à trois fois supérieure à celle observée lors de la transfection de EGFP. Ceci reproduit les expériences rapportées jusqu'à maintenant qui indiquent que l'expression de c-Myc aug-

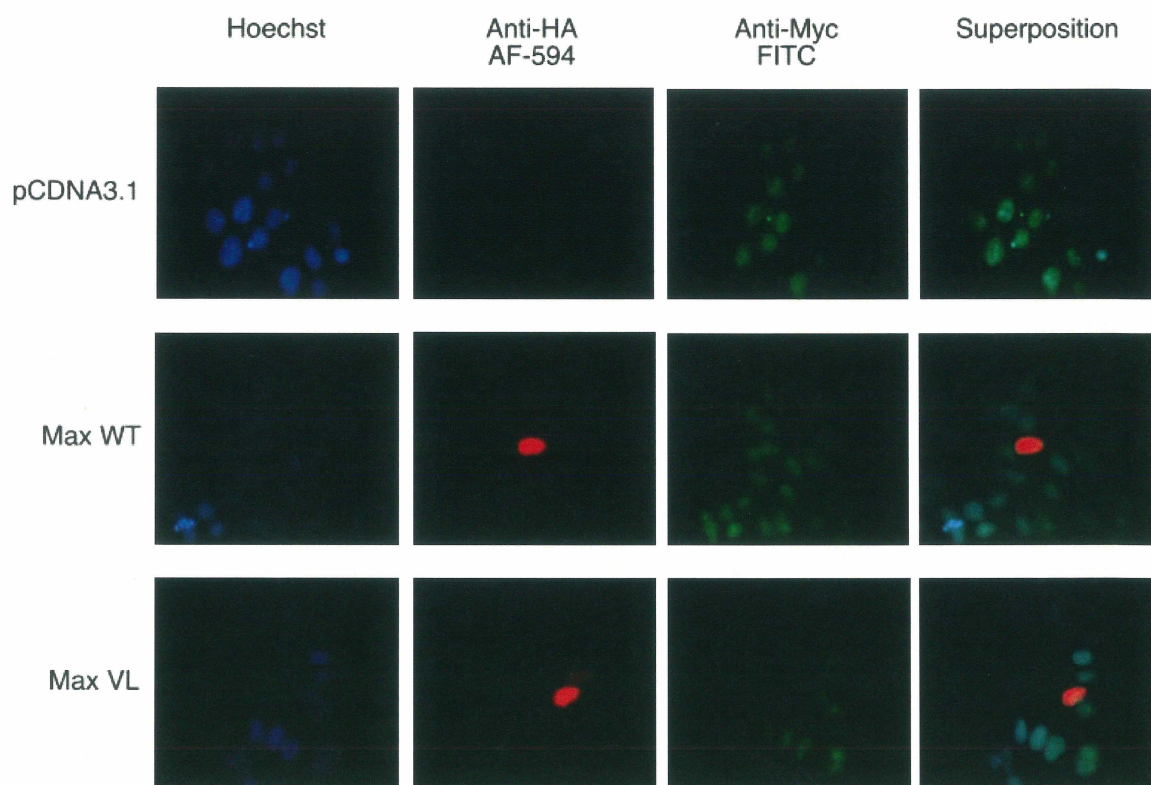


Figure 29 : Localisation de Max WT, Max VL et c-Myc dans les cellules HCT-116. La localisation cellulaire des différentes protéines a été déterminée par microscopie à épifluorescence. Les cellules ont été transfectées avec 1  $\mu$ g de pCDNA3.1, pCDNA3.1 contenant Max WT ou Max VL. La détection de l'expression de Max en utilisant l'anticorps anti-HA couplé à l'Alexa-Fluor 594 est seulement observée dans le noyau des cellules transfectées. Les images ont été prises 48 heures après la transfection avec un objectif 40X.

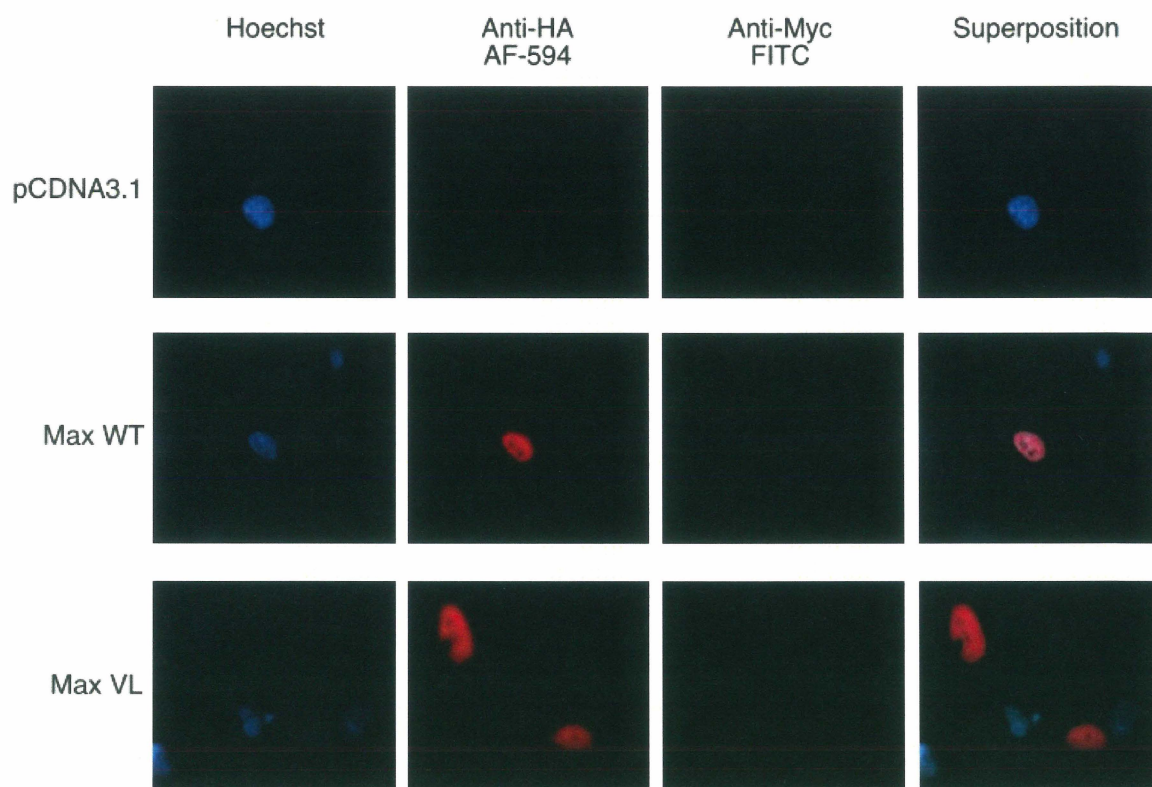


Figure 30 : Localisation de Max WT, Max VL et c-Myc dans les cellules HT-1080. La localisation cellulaire des différentes protéines a été déterminée par microscopie à épifluorescence. Les cellules ont été transfectées avec 1  $\mu$ g de pCDNA3.1, pCDNA3.1 contenant Max WT ou Max VL. La détection de l'expression de Max en utilisant l'anticorps anti-HA couplé à l'Alexa-Fluor 594 est seulement observée dans le noyau des cellules transfectées. Les images ont été prises 48 heures après la transfection avec un objectif à immersion de 100X.

mente de façon générale l'expression des gènes cibles de seulement deux à trois fois (GOUELI et JANKNECHT, 2003).

#### 3.3.4 Effet de la surexpression de Max WT et Max VL sur l'activité télomérase endogène dans les cellules EcR 293.

Puisque la surexpression de Max WT et Max VL dans les cellules HCT-116 diminue l'activité transcriptionnelle du promoteur de hTERT, nous avons voulu déterminer si nous pouvions diminuer l'activité télomérase endogène. Puisque les cellules HCT-116 sont difficiles à transfecter, nous avons transfecté de façon stable des cellules EcR 293 (Invitrogen). Cette approche nous permet d'obtenir un grand nombre de cellules exprimant Max WT ou Max VL en plus d'avoir l'avantage d'être inductibles à la ponastérone A lorsqu'elles sont transfectées avec le vecteur d'expression pIND (Invitrogen) car elles expriment de façon stable le récepteur à l'ecdysone provenant du plasmide pVgRXR (Invitrogen). Lors de l'ajout de la ponastérone A, les récepteurs à l'ecdysone exprimés dans les EcR 293 activent la transcription des gènes insérés dans pIND via les 5 éléments de réponse à l'ecdysone situés en amont du promoteur  $\Delta$ HSP. Donc, après la sélection clonale, nous avons vérifié que ceux-ci pouvaient exprimer Max WT et Max VL en présence de ponastérone A. L'expression de nos protéines recombinantes est détectée par immunobuvardage avec un anticorps dirigé contre la protéine Max à 25 kDa, confirmant la présence d'une étiquette HA en N-terminal de nos protéines (figure 33). La détection de nos protéines recombinantes concorde avec la détection d'une bande à 25 kDa observée dans les cellules HCT-116 transfectées



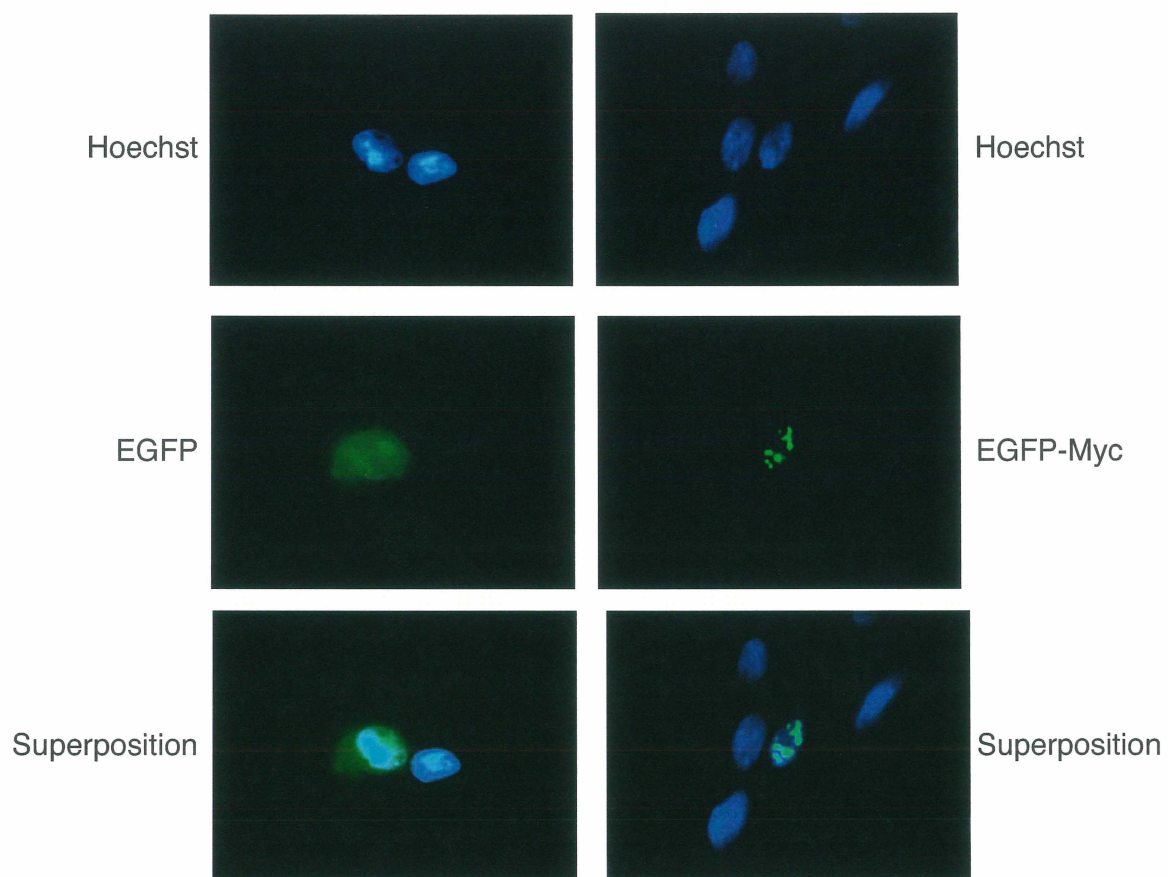


Figure 31 : Localisation de EGFP et MycEGFP dans les cellules HT-1080. La localisation cellulaire des différentes protéines a été déterminée par microscopie à épifluorescence. 1  $\mu$ g d'ADN a été utilisé pour chacune des transfections. Les images ont été prises 48 heures après la transfection avec un objectif à immersion de 100X.



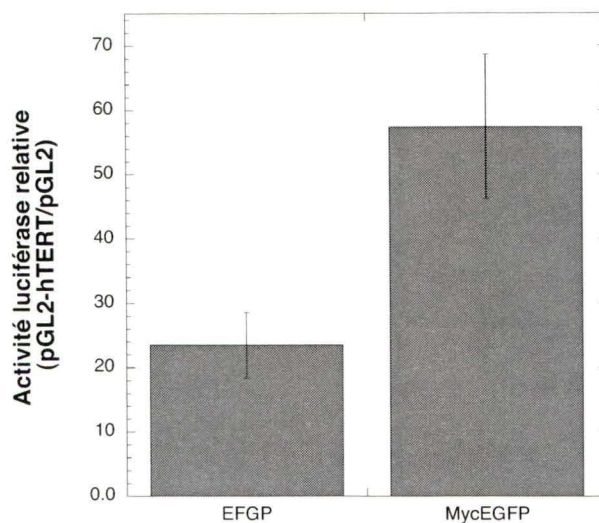


Figure 32 : Essais luciférase sur le promoteur hTERT dans les cellules HT-1080. Les essais luciférase ont été réalisés 48 heures après la transfection d'un vecteur d'expression contenant la EGFP ou MycEGFP. L'activité luciférase obtenue avec le plasmide rapporteur pGL2-hTERT a été comparée à celle obtenue avec le plasmide rapporteur sans promoteur, pGL2.

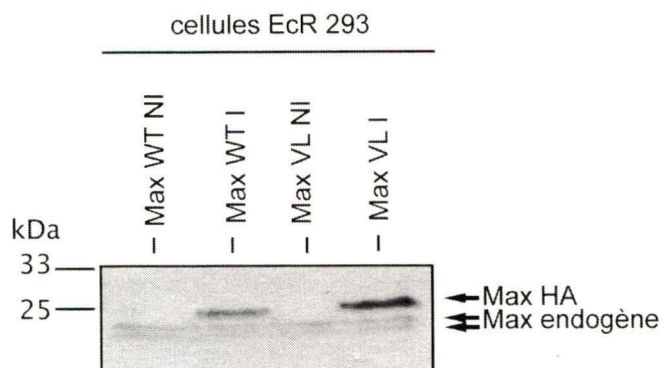


Figure 33 : Détection de l'induction des protéines Max recombinantes par immunobuvardage de type western dans les EcR 293. Les échantillons ont été prélevés 48 heures après l'induction à la ponastérone A de p21 Max WT ou de p21 Max VL.

transitoirement avec Max WT ou Max VL (figure 27). Contrairement aux cellules HCT-116, la protéine endogène est très bien détectée dans les EcR 293 (figure 33). Donc, après avoir vérifié l'expression de nos protéines recombinantes, nous avons testé l'effet de leur induction sur l'activité télomérase endogène par des essais TRAP. Cette technique permet de mesurer par amplification l'ajout des répétitions télomériques à un oligonucléotide par la télomérase.

Pour déterminer le taux d'inhibition de l'activité télomérase par essais TRAP, différentes dilutions des extraits provenant de cellules induites et non-induites ont été utilisées. Les résultats obtenus avec les extraits de cellules transfectées avec le vecteur pIND contenant l'insert Max WT ont été comparés aux extraits de cellules transfectées avec le vecteur pIND de base. L'induction de Max de type sauvage provoque une diminution de cinq fois de l'activité télomérase endogène (figure 34). Nous n'avons pas procédé pour le moment à l'analyse de l'activité télomérase lors de la surexpression de Max VL puisque ce dernier ne semble pas avoir une meilleure inhibition de la transcription. La diminution de l'activité télomérase suggère donc que la surexpression de Max peut diminuer la transcription du promoteur de hTERT endogène puisque la régulation de l'activité télomérase se fait majoritairement par la régulation de la transcription de la sous-unité catalytique (WEINRICH *et al.*, 1997).

À noter que l'essai TRAP présenté ici a été réalisé par Dr Louise Bouchard.

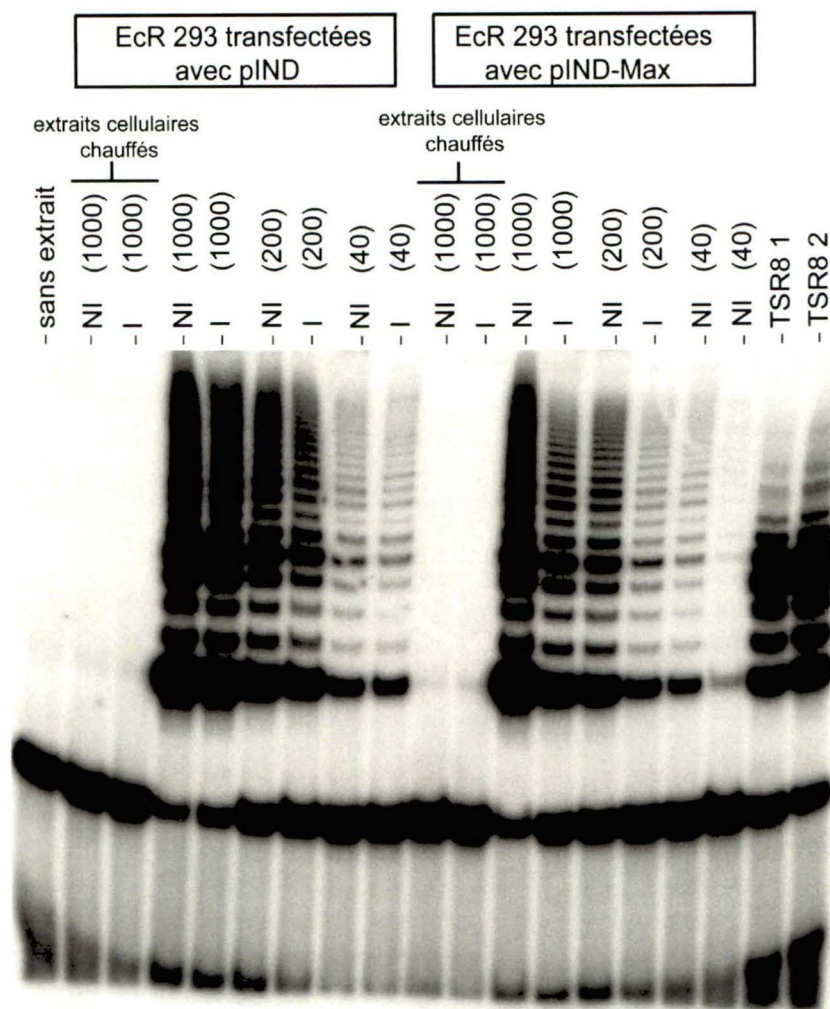


Figure 34 : Inhibition de l'activité télomérase analysée par essai TRAP lors de la surexpression de Max. La première piste est un contrôle négatif obtenu en utilisant seulement le tampon de lyse. Les 16 pistes suivantes présentent les résultats obtenus avec les extraits de cellules EcR 293 dont l'expression du vecteur pIND est non-induit (NI) ou induit (I) à la ponastérone A. Les 8 premières pistes ont été obtenues avec des extraits de cellules transfectées avec le plasmide pIND ne contenant aucun insert. Les 8 pistes subséquentes ont été obtenues avec des extraits de cellules transfectées avec le plasmide pIND contenant Max de type sauvage comme insert. Le nombre entre parenthèse représente le nombre de cellules utilisées pour la (suite de la légende page suivante)

réaction Les extraits cellulaires chauffés sont utilisés comme contrôles négatifs. Les dernières pistes sont obtenus en utilisant 1  $\mu$ L ou 2  $\mu$ L du contrôle TSR8 fourni avec la trousse d'Intergen pour estimer la quantité d'oligonucléotides TS qui ont été allongés avec des répétitions télomériques par la télomérase. TSR8 est un oligonucléotide ayant la même séquence que l'oligonucléotide TS auquel 8 séquences télomériques ont été ajoutées. Ces résultats ont été obtenus par Dr. Louise Bouchard.

## DISCUSSION

L'hypothèse directrice de cette thèse est que l'homodimère de Max antagonise l'activité de l'hétérodimère c-Myc/Max *in vivo*. Certaines évidences dans la littérature suggèrent que l'augmentation de l'expression de Max arrête la croissance et la prolifération cellulaire (CANELLES *et al.*, 1997). Le mécanisme d'action proposé par lequel l'homodimère Max pourrait inhiber l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère c-Myc/Max est par compétition pour les séquences E-Box retrouvées dans les promoteurs des gènes cibles. Ainsi, la surexpression de Max, son homodimérisation et sa liaison aux E-Box pourraient inhiber l'expression de gènes de croissance et de prolifération et aussi lever l'inhibition de la répression de la transcription de gènes cytotostatiques comme *P15INK4b* ou *P21CIP1*. Par contre, aucune donnée, *in vivo* ou *in vitro*, ne permet d'affirmer jusqu'à présent si la protéine Max entière (p21) peut homodimériser. Plusieurs études ont rapporté la caractérisation structurale et thermodynamique du domaine b-HLH-LZ, mais aucune n'a rapporté la caractérisation structurale et thermodynamique de la protéine complète p21 Max (CHAPITRE 2). En parallèle, nous avons procédé à la mutagenèse dirigée du domaine de dimérisation (HLH-LZ) afin d'optimiser sa stabilité thermodynamique sous la forme de dimère (CHAPITRE 1). La logique de cet objectif repose sur le fait qu'une plus grande stabilité de l'homodimère devrait se traduire en une plus grande affinité pour les E-box et ainsi optimiser les propriétés antagonistes de l'homodimère Max *in vivo* (CHAPITRE 3).

Afin d'augmenter la stabilité de l'homodimère Max, nous avons effectué deux mutations dans le leucine zipper (Max\*VL et Max\*VL/CG). Les acides aminés ciblés sont l'asparagine et l'histidine en position 78 et 81, que nous avons remplacés par une valine et une leucine, respectivement. Ces deux mutations augmentent le corps hydrophobe du leucine zipper de Max en plus d'éliminer une charge positive située à l'interface de dimérisation. Ces acides aminés seraient responsables de la réversibilité de dimérisation du domaine b-HLH-LZ de Max (LAVIGNE *et al.*, 1995; MUHLE-GOLL *et al.*, 1995; LAVIGNE *et al.*, 1998). En effet, ces acides aminés déstabilisent le leucine zipper de Max et participent à un pont salin à l'interface de l'hétérodimère c-Myc/Max (LAVIGNE *et al.*, 1998). Les analyses structurales et thermodynamiques obtenues par dichroïsme circulaire ont permis de confirmer que la double mutation augmentait grandement la stabilité de l'homodimère de Max et diminuait sa constante de dissociation de 10 000 fois. Le  $K_D(37^\circ\text{C})$  mesuré de Max\*/CG est de  $1 \cdot 10^{-4}$  comparativement à  $1.68 \cdot 10^{-9}$  pour Max\*VL/CG. Cette diminution de  $K_D$  est d'une très grande importance puisque le  $K_D$  obtenu ici pour Max\*/CG nous indique que le b-HLH-LZ de Max n'homodimériserait pas *in vivo*, tandis que celui de Max\*VL/CG le pourrait. En effet, pour homodimériser *in vivo*, Max doit avoir un  $K_D$  dans l'ordre de  $10^{-6}$  puisque la concentration nucléaire de Max est en léger excès (ADHIKARY et EILERS, 2005) comparativement à celle de c-Myc et que celle-ci a été estimée dans les fibroblastes humains dans l'ordre du micromolaire (NAIR et BURLEY, 2003). D'ailleurs, le  $K_D$  d'un hétérodimère de b-HLH-LZ c-Myc/Max est de  $1.76 \cdot 10^{-7}$  indiquant que celui-ci peut se former *in vivo* (HU et al, 2005). Le  $K_D$  déterminé pour Max\*/CG se rapproche de celui qui a été déterminé par le groupe de FIEBER *et al.* en 2001. Par contre, celui-ci est légèrement inférieur aux  $K_D$

déterminés par KRYLOV *et al.* en 1997 et par BERNAJEE *et al.* en 2006. La différence majeure entre les valeurs obtenues par ces deux groupes réside principalement dans la disparité des tampons utilisés, surtout au niveau de la force ionique. Ceux-ci ont utilisé une concentration de sel plus élevée que celle utilisée dans nos échantillons. L'autre différence est la séquence du domaine b-HLH-LZ de Max étudiée. La différence de force ionique est d'une grande importance tout comme la séquence utilisée dans l'étude de la stabilité. Ces deux points seront d'ailleurs discutés en détail plus loin dans la discussion des résultats obtenus lors de l'étude de la protéine complète. Finalement, l'étude de la liaison à l'ADN des différents b-HLH-LZ a été effectuée en mettant en présence les protéines recombinantes et un double brin d'ADN contenant un site E-Box. La caractérisation structurale nous permet d'observer que lorsque les protéines recombinantes sont en présence d'ADN, le domaine basique se replie pour lier le site E-Box. Ce constat avait aussi été rapporté par HORIUCHI *et al.* en 1997 avec une construction différente de la protéine Max. Ceci indique que le domaine basique doit changer de conformation lors de la liaison à l'ADN. Ce changement de conformation a été mis en évidence dans le détail par SAUVÉ *et al.*, 2006 et permettrait d'imposer une spécificité de liaison à l'ADN. De plus, les dénaturations thermiques indiquent que le domaine b-HLH-LZ est stabilisé en présence d'ADN. D'ailleurs les protéines contenant la double mutation ont une liaison à l'ADN plus stable que les protéines de type sauvage. La double mutation stabilise ainsi non seulement le domaine b-HLH-LZ, mais aussi le complexe b-HLH-LZ/ADN, tel que postulé initialement.



Puisque la double mutation stabilise grandement le domaine b-HLH-LZ de Max, nous avons vérifié si cette stabilisation était la même dans le contexte de la protéine complète, p21 Max. Cependant, nous devions, en premier lieu, caractériser la stabilité de p21 Max de type sauvage. Aucune analyse structurale et/ou thermodynamique n'a été faite sur cette protéine. Les résultats obtenus révèlent que l'homodimère de p21 Max est plus stable que son domaine b-HLH-LZ ( $K_D(37^\circ\text{C})$   $10^{-6}$  vs.  $10^{-4}$ , respectivement), mais que cette augmentation en stabilité n'est pas causée par le repliement de domaines additionnels. En effet, la caractérisation structurale par dichroïsme circulaire et par RMN indiquent que seul le domaine HLH-LZ de p21 Max est replié en absence d'ADN. Malgré cela, le dimère de p21 Max est beaucoup plus stable que le dimère du domaine b-HLH-LZ de type sauvage, Max\*/CG. Lors de l'étude de SAUVÉ *et al.*, ceux-ci ont remarqué qu'il y avait une déstabilisation du domaine HLH de Max due à une forte densité de résidus arginines et de lysines situés dans le domaine basique. Lorsqu'on regarde de plus près la séquence en acides aminés de p21 Max, on s'aperçoit que p21 Max possède plusieurs résidus acides en N-terminal du domaine basique. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle ces résidus acides pouvaient diminuer le potentiel électrostatique provoquant ainsi une diminution des répulsions. Nous avons simulé le potentiel électrostatique du b-HLH-LZ de Max et de p21 Max. Les résidus acides diminuent effectivement le potentiel électrostatique positif présent à la surface moléculaire. De plus, des expériences effectuées avec des tampons possédant des forces ioniques croissantes révèlent que la stabilité du domaine b-HLH-LZ de Max\*/CG est augmentée lorsque la force ionique est forte. Ceci montre que l'augmentation de la concentration de sel masque les charges potentielles déstabilisantes de Max\*/CG.

Contrairement à Max\*/CG, la stabilité de p21 Max n'est pas affectée par l'augmentation de la force ionique du tampon indiquant que la présence des charges négatives en N-terminal du domaine basique diminue les répulsions déstabilisantes tel que postulé. Le fait que les parties N- et C-terminales ne soient pas repliées est intéressant puisque ce résultat diffère de celui qui a été observé avec l'autre isoforme de Max, soit p22 Max (PURSGLOVE *et al.*, 2004). Ceci suggère que p21 et p22 Max possèdent des propriétés différentes qui pourraient se refléter par des rôles différents comme proposés plus loin.

Lors de notre étude, nous avons avancé l'hypothèse que le LZ de Max de type sauvage subissait des transitions locales où le domaine LZ est non replié à 100% menant à la déstabilisation du domaine b-HLH-LZ en entier. Cette déstabilisation se reflète soit par une diminution de la population dimérique (1) et/ou dans le pourcentage de structure repliée (2) de l'homodimère p21Max. Puisque la concentration de nos échantillons est de 32  $\mu\text{M}$  et est supérieure au  $K_D$  de  $1 \cdot 10^{-6}$  déterminée pour p21 Max, la seconde hypothèse est plus probable. Nous confirmons cette seconde hypothèse lors de l'analyse des coefficients de vitesse par ultracentrifugation. Nous observons lors de ces expériences une augmentation du ratio  $f/f_0$  (1.5 vs. 1.69 pour p21 Max vs. p21 Max VL), indiquant que l'asymétrie de la protéine mutante est plus grande. Cette augmentation est causée par un domaine LZ plus structuré pour p21 Max VL. Les simulations des courbes de dénaturation nous permettent de déterminer un  $K_D$  de  $3 \cdot 10^{-10}$  pour p21 Max VL. Ainsi, la double mutation stabilise l'homodimère de p21 Max tout comme elle stabilise le domaine b-HLH-LZ. Cependant, le  $K_D$  déterminé pour p21 Max indique que l'homodimérisation de la protéine p21 Max est possible à des concentrations

physiologiques. Ces résultats supportent notre hypothèse selon laquelle l'homodimère de Max existe *in vivo* et compétitionne avec l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère c-Myc/Max. L'étude thermodynamique des complexes p21 Max/ADN et p21 Max VL/ADN montre également une augmentation de la stabilité du complexe avec la protéine mutante nous permettant de proposer que p21 Max VL pourrait être un meilleur inhibiteur de l'hétérodimère c-Myc/Max.

Puisque le  $K_D$  obtenu pour p21 Max suggère que la protéine peut dimériser *in vivo*, nous avons déterminé l'effet de l'expression de Max dans des cellules possédant une forte activité télomérase. Plus précisément, nous avons vérifié si l'expression de Max *in vivo* pouvait mener à la répression de la transcription du promoteur hTERT, dont l'activité transcriptionnelle est régulée par l'hétérodimère c-Myc/Max (KYO *et al.*, 2000). Nous avons caractérisé l'effet sur un plasmide rapporteur contenant le promoteur de hTERT placé en amont d'une séquence encodant la luciférase. Selon l'hypothèse de départ, la surexpression de Max devrait diminuer l'activité luciférase puisque celle-ci est causée par l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère c-Myc/Max sur le promoteur de hTERT. Les résultats obtenus montrent que la protéine Max peut réprimer l'activation de la transcription de ce promoteur. Cette étude a été effectuée dans des cellules HCT-116 qui surexpriment c-Myc (VAN DE WETERING, 2002). L'activité du promoteur est diminuée de deux à trois fois, ce qui correspond à l'inhibition de la transcription qui est normalement induite par c-Myc (GOUELI et JANKNECHT, 2003). Il semble donc que la surexpression de Max dans ces cellules vient déplacer l'hétérodimère c-Myc/Max et que ceci résulte en une diminution de l'activité transcriptionnelle du promoteur de hTERT. La

surexpression de Max dans les cellules HT-1080, qui possèdent une forte activité télomérase, mais où c-Myc est non-déTECTable, n'affecte pas l'activité du promoteur de hTERT. Ceci indique que l'activation du promoteur de hTERT n'est pas causée par l'hétérodimère c-Myc/Max et explique pourquoi la surexpression de l'homodimère Max ne diminue pas l'activité du promoteur dans ces cellules. Cependant, l'expression de Max dans les cellules HCT-116 ne parvient pas à diminuer l'activité du promoteur de hTERT à un niveau aussi bas que celui observé dans les cellules HT-1080 transfectées avec pCDNA3.1, suggérant que d'autres facteurs de transcription pourraient être responsables de l'activation du promoteur en plus de l'hétérodimère c-Myc/Max dans ces cellules. Parmi les facteurs de transcription possible, notons les protéines SP1 (KYO *et al.*, 2000), les récepteurs à l'estrogène (KYO *et al.*, 1999) et les protéines USF (GOUELI et JANKNECHT, 2003). Toutes ces protéines sont des facteurs de transcription qui stimulent la transcription du promoteur de hTERT.

À notre grand étonnement, nous avons observé que Max VL inhibait moins efficacement la transcription du promoteur de hTERT malgré une plus grande capacité à homodimériser à plus faible concentration et à former un complexe protéine/ADN plus stable. Il semble même que Max VL serait un moins bon inhibiteur que p21 Max de type sauvage. Cette conclusion est basée sur la cinétique d'inhibition de Max WT versus Max VL provenant de trois expériences indépendantes. Cette différence d'inhibition de 10% entre Max WT et Max VL est stable sur une période de 72 heures et n'est pas causée par une mauvaise expression ou d'une mauvaise localisation cellulaire de Max VL, puisque lors des expériences en immunofluorescence, celui-ci est retrouvé exclusivement au

noyau, tout comme Max de type sauvage. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette différence d'inhibition. Parmi celles-ci, soulignons la possibilité que les mutations à l'intérieur du LZ de Max aient créé des sites de reconnaissance moléculaire pour d'autres protéines. Il est aussi possible que l'augmentation de la stabilité Max VL influence son l'affinité pour des sites de liaison non-spécifiques sur l'ADN. Nous préférons cette hypothèse car nous avons observé que Max VL forme un complexe beaucoup plus stable avec un site de liaison spécifique que p21 Max. On peut donc supposer que p21 Max VL pourrait aussi mieux lier des sites non-spécifiques et compétitionnerait moins efficacement avec l'hétérodimère c-Myc/Max pour les E-Box. La différence de stabilité entre les valeurs de  $K_D$  obtenues pour le b-HLH-LZ de Max et de Max VL pour un site spécifique est de 100X. Par contre, bien qu'aucune valeur de  $K_D$  n'ait été mesurée pour la liaison de Max à un site non-spécifique, des résultats obtenus dans le laboratoire viennent supporter cette hypothèse (SAUVÉ *et al.*, soumis). Les constantes de dissociation pour un site spécifique et non-spécifique pour le domaine b-HLH-LZ de Max VL ont été mesurées et la différence entre les deux n'est que de 100X ( $1 \cdot 10^{-8}$  vs.  $1 \cdot 10^{-6}$ ). Le  $K_D$  mesuré pour la liaison à un site spécifique par le b-HLH-LZ de Max de type sauvage est le même que le  $K_D$  mesuré pour la liaison du b-HLH-LZ de Max VL à un site non-spécifique. Nous pouvons donc croire que la liaison à des sites non-spécifiques crée une diminution de la concentration effective de Max VL pour la liaison spécifique aux sites E-Box du promoteur de hTERT de notre plasmide rapporteur, ce qui expliquerait la baisse du potentiel inhibiteur de Max VL.

Finalement, nous avons vérifié l'effet de la surexpression de l'homodimère Max sur la transcription d'un gène cible de c-Myc dans son contexte naturel, c'est-à-dire sur le promoteur de hTERT endogène. Les cellules EcR 293 utilisées lors de ces expériences possèdent une activité de la télomérase qui est majoritairement contrôlée par la transcription de sa sous-unité catalytique, hTERT. Nous avons mesuré l'activité télomérase avant et après la surexpression de Max de type sauvage dans ces cellules. Les résultats obtenus indiquent que l'activité de la télomérase est réduite quand les cellules surexpriment Max. Le modèle avancé ici pour expliquer la diminution de l'activité télomérase est le déplacement de l'hétérodimère c-Myc/Max par l'homodimère Max/Max, mais d'autres expériences seront nécessaires pour bien caractériser l'effet de l'expression de Max dans ces cellules.

## CONCLUSION

Trois points majeurs ont été caractérisés lors de cette thèse (figure 35). Nous avons analysé et confirmé l'hypothèse selon laquelle les résidus N78 et H81 étaient responsables de la déstabilisation et de la réversibilité de l'homodimère de Max. La mutation de ces deux résidus augmente grandement la stabilité de l'homodimère autant à l'intérieur du domaine b-HLH-LZ que de la protéine complète. Nous avons aussi montré pour la première fois que le domaine HLH et LZ du b-HLH-LZ pouvait se dénaturer de façon indépendante. Cette observation est très importante puisqu'elle permet de montrer que b-HLH-LZ de Max possède des transitions passagères où le domaine LZ est non replié. Ces transitions peuvent être observées même lors de la liaison à l'ADN. Elles sont probablement importantes pour la réversibilité de dimérisation de Max tout en permettant l'hétérodimérisation avec les protéines de la famille Myc ou Mad. Il est aussi intéressant de noter que les constantes de dissociation déterminées pour le b-HLH-LZ de Max et la protéine complète sont très différentes ( $10^{-4}$  pour le b-HLH-LZ vs.  $10^{-6}$  pour p21 Max) et indiquent que la protéine complète peut homodimériser *in vivo*. La stabilisation de la protéine complète est due à la présence de résidus acides situés dans la partie N-terminale qui diminuent les répulsions causées par les résidus basiques. L'importance de ces résidus en N-terminal pour l'homodimérisation *in vivo* reste à caractériser, mais ils sont déjà important pour la phosphorylation de la protéine et la régulation de la liaison à l'ADN (BOUSSET *et al.*, 1993). De plus, nous avons aussi montré que la présence de ces résidus en N-terminal ne provoquait pas le repliement de régions supplémentaires de la

protéines puisque celle-ci a seulement le domaine HLH-LZ de replié en absence d'ADN tout comme le b-HLH-LZ.

Nous avons aussi confirmé l'hypothèse selon laquelle la surexpression de Max pouvait inhiber la transcription d'un gène cible de c-Myc. La surexpression de Max, dans des cellules possédant un niveau élevé de c-Myc et d'activité télomérase, réduit l'activité transcriptionnelle du promoteur de hTERT, la sous-unité catalytique de la télomérase. Cette diminution semble causée par l'occupation des E-Box par l'homodimère Max et par le déplacement de l'hétérodimère c-Myc/Max puisque la surexpression de Max dans des cellules ne possédant pas un niveau détectable de c-Myc ne résulte pas en une diminution de l'activité transcriptionnelle du promoteur. De plus, l'expression de Max dans les EcR 293 s'accompagne d'une diminution de l'activité télomérase et ce probablement par une diminution de la transcription de hTERT puisque l'activité télomérase est majoritairement contrôlée via la transcription de sa sous-unité catalytique. Par contre, d'autres expériences devront être effectuées pour déterminer si la surexpression de Max peut mener à la différenciation cellulaire. Parmi les observations qui ont mené au fondement de cette hypothèse, il y a celles que la concentration de Max pouvait augmenter lors de la réponse au TGF- $\beta$  (SIEGEL *et al.*, 2003) et lors de la migration des cellules intestinales dans l'axe crypte-villus de l'épithélium intestinal (MARIADASON *et al.*, 2005). Cette augmentation, couplée à une diminution de la concentration de c-Myc, peut mener à la liaison de l'homodimère Max aux sites E-Box des promoteurs activés par c-Myc en remplaçant l'hétérodimère c-Myc/Max. De plus, l'augmentation de la concentration de Max de concert avec une diminution de la transcription de c-Myc



pourrait prévenir la formation d'hétérodimères en favorisation la formation d'homodimère par la loi d'action de masse. Cette diminution d'hétérodimères pourrait lever l'inhibition apportée par ces derniers sur les promoteurs réprimés par c-Myc.

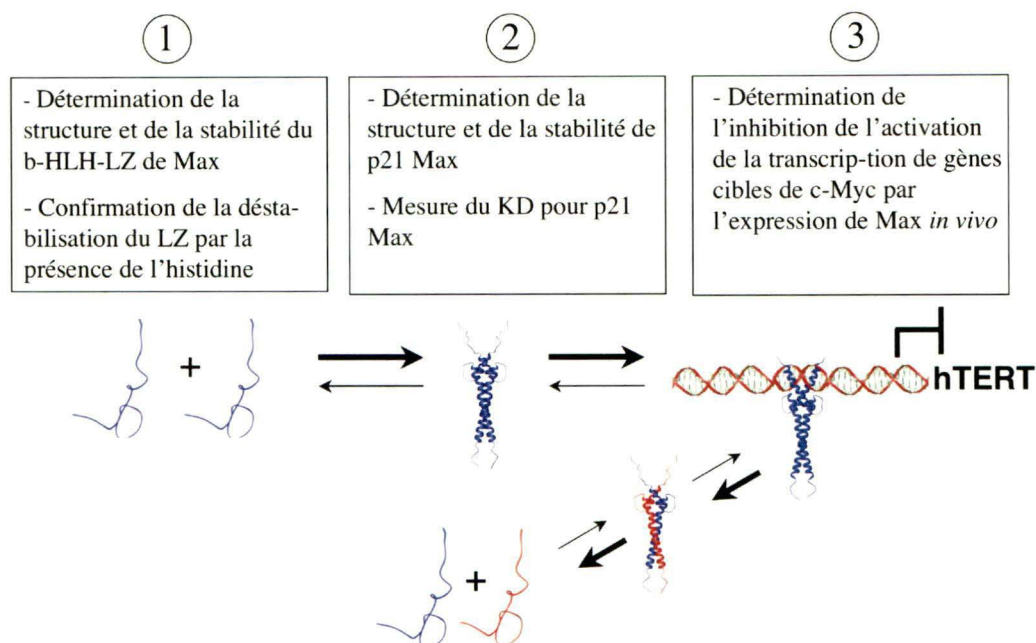


Figure 35 : Résumé des objectifs et des résultats obtenus de l'étude présentée dans cette thèse. 1- Nous avons déterminé la structure et la stabilité de l'homodimère du b-HLH-LZ de Max. Cette caractérisation nous a permis de montrer l'histidine est responsable de la déstabilisation du LZ et du domaine b-HLH-LZ en entier. 2- Nous avons analysé la structure et la stabilité du produit de gène complet d'un des isoformes de Max. Nous avons déterminé un  $K_D$  pour cette protéine. La valeur obtenue,  $10^{-6}$ , permet à ce dernier d'homodimériser *in vivo*. 3- Nous avons confirmé que la surexpression de Max réprime la transcription de gènes cibles de c-Myc autant sur un promoteur d'un vecteur rapporteur que sur un promoteur endogène. Le mécanisme avancé ici pour expliquer cette inhibition est le déplacement de l'hétérodimère c-Myc/Max par l'homodimère Max/Max sur les sites E-Box. Finalement, nous avons caractérisé le b-HLH-LZ, la protéine complète et l'inhibition de la transcription d'un mutant de la protéine Max possédant un  $K_D$  beaucoup plus faible que la protéine de type sauvage.

## PERSPECTIVES

Les résultats obtenus avec p21 Max sont intéressants puisqu'ils diffèrent avec ceux l'isoforme plus long. Dans l'étude sur p22 Max, il a été observé que celui-ci possédait des régions N- et C-terminales repliées (PURSGLOVE *et al.*, 2004). Les auteurs ont avancé que le repliement de la partie N-terminale pourrait expliquer la différence de régulation entre p21 Max et p22 Max, lors de l'apoptose. Par contre, aucune donnée sur la structure de p21 Max en solution n'avait été rapportée jusqu'à maintenant. Nos résultats indiquent que la partie N-terminale de p21 Max est non repliée. Le repliement de la région N-terminale, causée par la présence des 9 acides aminés supplémentaires, semble donc être requis pour le clivage de Max. En effet, il a été démontré que la caspase 5 clive p22 Max et que ce clivage par cette protéase est beaucoup moins fréquent chez p21 Max lors de l'activation de l'apoptose par Fas (KRIPPNER-HEIDENREICH *et al.*, 2001). De plus, ce clivage augmente l'affinité à l'ADN de p22 Max *in vitro* (PURSGLOVE *et al.*, 2004). Cette augmentation d'affinité pour l'ADN est également observée lors du clivage de p22 Max *in vivo* (KRIPPNER-HEIDENREICH *et al.*, 2001). Pour le moment, aucun rôle précis n'est encore associé à ce clivage. Cependant, les résultats obtenus par KRIPPNER-HEIDENREICH suggèrent que la modulation des fonctions des protéines du réseau Myc/Max/Mad via le clivage de Max est un événement précoce lors de l'activation de l'apoptose. Ce réseau est déjà associé de près au processus apoptotique (HUEBER et EVAN, 1998; GEHRING *et al.*, 2000; FOLEY *et al.*, 1998; QUEVA *et al.*, 2001). Il serait donc intéressant de voir si cette différence de régulation entre p21 Max et p22 Max peut octroyer différents rôles dans d'autres contexte cellulaire

comme la prolifération, la croissance et la différenciation cellulaire en modulant l'affinité des hétérodimères Myc/Max et Mad/Max. Il serait intéressant d'étudier l'effet de la surexpression de p21 Max et p22 Max sur la différenciation cellulaire dans les HCT-116 et/ou dans d'autres cellules qui possèdent un niveau élevé de c-Myc. Puisque les HCT-116 sont des cellules cancéreuses dans lesquelles une diminution du niveau de c-Myc permet à nouveau aux cellules de se différencier (VAN DE WETERING, 2002), il serait intéressant d'aller vérifier l'effet de la surexpression de Max sur un ensemble de gènes cibles de c-Myc dans ces cellules. Ceci permettrait aussi déterminer si la différence d'inhibition entre Max WT et Max VL est biologiquement significative. Cependant, il faudrait infecter les cellules avec un virus (ex. : un lentivirus) pour avoir un nombre suffisant de cellules exprimant Max WT et/ou Max VL. De plus, il serait important d'effectuer la caractérisation de la liaison à l'ADN spécifique et non spécifique avec le domaine b-HLH-LZ et la protéine complète pour déterminer la cause exacte de la diminution d'inhibition de la transcription par Max VL.

Finalement, il serait aussi intéressant d'étudier l'effet de la surexpression de Max sur les promoteurs de gènes qui sont réprimés par c-Myc. Nous avons montré que l'augmentation de la concentration de Max pouvait prévenir la formation d'hétérodimères en favorisant la formation d'homodimère par la loi d'action de masse. L'augmentation d'homodimère de Max provoque l'inhibition de la transcription de gènes cibles de c-Myc. Il serait maintenant intéressant de vérifier si la surexpression de Max peut briser l'interaction entre la protéine Miz-1 et Myc en prévenant la formation d'hétérodimères c-Myc/Max.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mes directeurs de recherche pour leur soutien et leurs conseils pendant toutes ces années. J'aimerais aussi remercier mes collègues avec qui j'ai partagé les bons et les moins bons moments. Particulièrement, François-Olivier McDuff et Simon Sauvé avec qui j'ai changé le monde bien des fois! Je remercie aussi tous les membres du département de microbiologie et d'infectiologie ainsi que ceux du département de pharmacologie que j'ai côtoyé pendant ces 6 dernières années. Il ne faut pas que j'oublie mes bons vieux amis qui sont à mes côtés depuis le primaire et le secondaire, Jean-Sébastien, André et Benoit, merci d'être là. Il y a aussi une autre personne qui est très importante pour moi, tant pour son soutien dans mon travail que dans ma vie quotidienne. Eve-Lyne, merci d'être là, les mots me manquent pour te dire comment je suis heureux de partager ma vie avec toi. Finalement, j'aimerais remercier mes parents sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi!

## RÉFÉRENCES

- ADHIKARY S, EILERS M. (2005) Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6, 635-45.
- ALITALO K, SCHWAB M, LIN CC, VARMUS HE, BISHOP JM. (1983) Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80, 1707-11.
- AMATI B, FRANK SR, DONJERKOVIC D, TAUBERT S (2001) Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription, *Biochim Biophys Acta.* 1471, 135-45
- AUTEXIER C, PRUZAN R, FUNK WD, GREIDER CW. (1996) Reconstitution of human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA, *EMBO J.* 15, 5928-35.
- ARABI A, WU S, RIDDERSTRALE K, BIERHOFF H, SHIUE C, FATYOL K, FAHLEN S, HYDBRING P, SODERBERG O, GRUMMT I, LARSSON LG, WRIGHT AP (2005) c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription, *Nat Cell Biol.* 7, 303-10
- ARSURA M, DESHPANDE A, HANN SR, SONENSHEIN GE. (1995) Variant Max protein, derived by alternative splicing, associates with c-Myc in vivo and inhibits transactivation, *Mol Cell Biol.* 15, 6702-9.
- AYER DE, KRETZNER L, EISENMAN RN. (1993) Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity, *Cell* 72, 211-22
- AYER DE, LAWRENCE QA, EISENMAN RN. (1995) Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3, *Cell* 80, 767-76
- BAHRAM F, VON DER LEHR N, CETINKAYA C, LARSSON LG. (2000) c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover, *Blood* 95, 2104-10.
- BANERJEE A, HU J, GOSS DJ. (2006) Thermodynamics of protein-protein interactions of cMyc, Max, and Mad: effect of polyions on protein dimérisation, *Biochemistry* 45; 2333-8.

BAUDINO TA, MCKAY C, PENDEVILLE-SAMAIN H, NILSSON JA, MACLEAN KH, WHITE EL, DAVIS AC, IHLE JN, CLEVELAND JL. (2002) c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression, *Genes Dev.* 16, 2530-43.

BARRERA-HERNANDEZ G, CULTRARO CM, PIANETTI S, SEGAL S. (2000) Mad1 function is regulated through elements within the carboxy terminus, *Mol Cell Biol.* 20, 4253-64.

BLACKBURN EH. (2001) Switching and signaling at the telomere, *Cell* 106, 661-73.

BLACKWOOD EM, EISENMAN RN. (1991) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc, *Science* 251, 1211-7.

BLACKWOOD EM, LUSCHER B, EISENMAN RN. (1992) Myc and Max associate in vivo, *Genes Dev.* 6, 71-80.

BLOBE GC, SCHIEMANN WP, LODISH HF. (2000) Role of transforming growth factor beta in human disease, *N Engl J Med.* 2000 342,1350-8.

BODNAR AG, OUELLETTE M, FROLKIS M, HOLT SE, CHIU CP, MORIN GB, HARLEY CB, SHAY JW, LICHTSTEINER S, WRIGHT WE. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells, *Science* 279, 349-52.

BERWANGER B, HARTMANN O, BERGMANN E, BERNARD S, NIELSEN D, KRAUSE M, KARTAL A, FLYNN D, WIEDEMAYER R, SCHWAB M, SCHAFFER H, CHRISTIANSEN H, EILERS M. (2002) Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma, *Cancer Cell.* 2, 377-86

BOUCHARD C, DITTRICH O, KIERMAIER A, DOHMANN K, MENKEL A, EILERS M, LUSCHER B. (2001) Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter, *Genes Dev.* 15, 2042-7.

BOUCHARD C, MARQUARDT J, BRAS A, MEDEMA RH, EILERS M. (2004) Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J.* 23, 2830-40.

BOUSSET K, OELGESCHLAGER MH, HENRIKSSON M, SCHREEK S, BURKHARDT H, LITCHFIELD DW, LUSCHER-FIRZLAFF JM, LUSCHER B. (1994) Regulation of transcription factors c-Myc, Max, and c-Myb by casein kinase II, *Cell Mol Biol Res.* 40, 501-11

BOYD KE, WELLS J, GUTMAN J, BARTLEY SM, FARNHAM PJ. (1998) c-Myc target gene specificity is determined by a post-DNA binding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 13887-92.

BRENNER C, DEPLUS R, DIDELOT C, LORIOT A, VIRE E, DE SMET C, GUTIERREZ A, DANOVI D, BERNARD D, BOON T, PELICCI PG, AMATI B, KOUZARIDES T, DE LAUNOIT Y, DI CROCE L, FUKS F. (2005) Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor, *EMBO J*. 24, 336-46.

BROWNLIE P, CESKA T, LAMERS M, ROMIER C, STIER G, TEO H, SUCK D. (1997) The crystal structure of an intact human Max-DNA complex: new insights into mechanisms of transcriptional control, *Structure* 5, 509-20.

CANELLES M, DELGADO MD, HYLAND KM, LERGA A, RICHARD C, DANG CV, LEON J. (1997) Max and inhibitory c-Myc mutants induce erythroid differentiation and resistance to apoptosis in human myeloid leukemia cells, *Oncogene* 14; 1315-27.

CARSON, M. (1987) Ribbon Models of Macromolecules. *J Mol Graph* 5, 103-06

CHAO H, HOUSTON ME JR, GROTHE S, KAY CM, O'CONNOR-MCCOURT M, IRVIN RT, HODGES RS. (1996) Kinetic study on the formation of a de novo designed heterodimeric coiled-coil: use of surface plasmon resonance to monitor the association and dissociation of polypeptide chains, *Biochemistry* 35, 12175-85.

CHAO H, BAUTISTA DL, LITOWSKI J, IRVIN RT, HODGES RS. (1998) Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 715, 307-29.

CHAREST G, LAVIGNE P. (2006) Simple and versatile restraints for the accurate modeling of alpha-helical coiled-coil structures of multiple strandedness, orientation and composition, *Biopolymers* 81, 202-14.

CHEN YH, YANG JT, CHAU KH. (1974) Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism, *Biochemistry* 13; 3350-9.

CHENG SW, DAVIES KP, YUNG E, BELTRAN RJ, YU J, KALPANA GV. (1999) c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function, *Nat Genet*. 22, 102-5.

COHEN DE, PROCHOWNIK EV. (2006) A functional hierarchy for c-Myc target genes? Lessons from MT-MC1, *Cell Cycle* 5, 392-3.



CULTRARO CM, BINO T, SEGAL S. (1997) Function of the c-Myc antagonist Mad1 during a molecular switch from proliferation to differentiation, *Mol Cell Biol.* 17, 2353-9.

DELAGLIO F, GRZESIEK S, VUISTER GW, ZHU G, PFEIFER J, BAX A. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J Biomol NMR.* 6, 277-93.

DRAYTON S, ROWE J, JONES R, VATCHEVA R, CUTHBERT-HEAVENS D, MARSHALL J, FRIED M, PETERS G. (2003) Tumor suppressor p16INK4a determines sensitivity of human cells to transformation by cooperating cellular oncogenes, *Cancer Cell* 4, 301-10.

DUNN BK, COGLIATI T, CULTRARO CM, BAR-NER M, SEGAL S. (1994) Regulation of murine Max (Myn) parallels the regulation of c-Myc in differentiating murine erythroleukemia cells. *Cell Growth Differ.* 5, 847-54.

EBERHARDY SR, FARNHAM PJ. (2002) Myc recruits P-TEFb to mediate the final step in the transcriptional activation of the cad promoter, *J Biol Chem.* 277, 40156-62.

EBERHARDY SR, FARNHAM PJ. (2001) c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *J Biol Chem.* 276, 48562-71

EL-DEIRY WS, HARPER JW, O'CONNOR PM, VELCULESCU VE, CANMAN CE, JACKMAN J, PIETENPOL JA, BURRELL M, HILL DE, WANG Y, ET AL. (1994) WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis, *Cancer Res.* 54, 1169-74.

ETARD C, GRADL D, KUNZ M, EILERS M, WEDLICH D. (2005) Pontin and Reptin regulate cell proliferation in early *Xenopus* embryos in collaboration with c-Myc and Miz-1, *Mech Dev.* 122, 545-56.

FENG XH, LIANG YY, LIANG M, ZHAI W, LIN X. (2002) Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta-mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B), *Mol Cell.* 9, 133-43

FERRE-D'AMARE AR, PRENDERGAST GC, ZIFF EB, BURLEY SK. (1993) Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain, *Nature*, 363, 38-45.

- FIEBER W, SCHNEIDER ML, MATT T, KRAUTLER B, KONRAT R, BISTER K. (2001) Structure, function, and dynamics of the dimerization and DNA-binding domain of oncogenic transcription factor v-Myc, *J Mol Biol.* 307; 1395-410.
- FERNANDEZ PC, FRANK SR, WANG L, SCHROEDER M, LIU S, GREENE J, COCITO A, AMATI B. (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev.* 17, 1115-29.
- FOLEY KP, MCARTHUR GA, QUEVA C, HURLIN PJ, SORIANO P, EISENMAN RN. (1998) Targeted disruption of the MYC antagonist MAD1 inhibits cell cycle exit during granulocyte differentiation, *EMBO J.* 17; 774-85.
- FUCHS M, GERBER J, DRAPKIN R, SIF S, IKURA T, OGRYZKO V, LANE WS, NAKATANI Y, LIVINGSTON DM. (2001) The p400 complex is an essential E1A transformation target, *Cell* 106, 297-307.
- GARDNER, L., LEE, L. AND DANG, C. (2002) c-Myc Protooncogene, *Encyclopedia of Cancer 2<sup>e</sup> édition*, Academic Press, 555-561
- GALAKTIONOV K, CHEN X, BEACH D. (1996) Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc, *Nature.* 382, 511-7.
- GEHRING S, ROTTMANN S, MENKEL AR, MERTSCHING J, KRIPPNER-HEIDENREICH A, LUSCHER B. (2000) Inhibition of proliferation and apoptosis by the transcriptional repressor Mad1. Repression of Fas-induced caspase-8 activation, *J Biol Chem.* 275; 10413-20.
- GLOVER JN, HARRISON SC. (1995) Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA, *Nature* 373, 257-61.
- GOUELI BS, JANKNECHT R. (2003) Regulation of telomerase reverse transcriptase gene activity by upstream stimulatory factor, *Oncogene* 22; 8042-7.
- GRANDORI C, COWLEY SM, JAMES LP, EISENMAN RN. (2000) The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior, *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16, 653-99
- GREGORY MA, QI Y, HANN SR. (2003) Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization, *J Biol Chem.* 278, 51606-12.
- GREWAL SS, LI L, ORIAN A, EISENMAN RN, EDGAR BA. (2005) Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during *Drosophila* development, *Nat Cell Biol.* 7, 295-302.

GU W, CECHOVA K, TASSI V, DALLA-FAVERA R. (1993) Opposite regulation of gene transcription and cell proliferation by c-Myc and Max, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 2935-9.

GUCCIONE E, MARTINATO F, FINOCCHIARO G, LUZI L, TIZZONI L, DALL'OLIO V, ZARDO G, NERVI C, BERNARD L, AMATI B. (2006) Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context, *Nat Cell Biol.* 8,764-70.

HANAHAHAN D, WEINBERG RA. (2000) The hallmarks of cancer, *Cell* 2000 100, 57-70

HARBURY PB, ZHANG T, KIM PS, ALBER T. (1993) A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants, *Science* 262, 1401-7.

HARBURY PB, KIM PS, ALBER T. (1994) Crystal structure of an isoleucine-zipper trimer, *Nature* 371, 80-3.

HARLEY CB. (2002) Telomerase is not an oncogene, *Oncogene* 21, 494-502.

HEINZEL T, LAVINSKY RM, MULLEN TM, SODERSTROM M, LAHERTY CD, TORCHIA J, YANG WM, BRARD G, NGO SD, DAVIE JR, SETO E, EISENMAN RN, ROSE DW, GLASS CK, ROSENFELD MG. (1997) A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression, *Nature.* 387, 43-8.

HERBST A, HEMANN MT, WORKOWSKI KA, SALGHETTI SE, LOWE SW, TANSEY WP. (2005) A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity, *EMBO Rep.* 6, 177-83

HERBST A, SALGHETTI SE, KIM SY, TANSEY WP. (2004) Multiple cell-type-specific elements regulate Myc protein stability, *Oncogene* 23, 3863-71.

HORIUCHI M, KURIHARA Y, KATAHIRA M, MAEDA T, SAITO T, UESUGI S. (1997) Dimerization and DNA binding facilitate alpha-helix formation of Max in solution, *J Biochem* 122; 711-6.

HU J, BANERJEE A, GOSS DJ. (2005) Assembly of b/HLH/z proteins c-Myc, Max, and Mad1 with cognate DNA: importance of protein-protein and protein-DNA interactions, *Biochemistry*, 44, 11855-63.

HUEBER AO, EVAN GI. (1998) Traps to catch unwary oncogenes, *Trends Genet.* 14; 364-7.

HURLIN PJ, QUEVA C, KOSKINEN PJ, STEINGRIMSSON E, AYER DE, COPELAND NG, JENKINS NA, EISENMAN RN. (1996) Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *EMBO J.* 15, 2030

IZUMI H, MOLANDER C, PENN LZ, ISHISAKI A, KOHNO K, FUNA K. (2001) Mechanism for the transcriptional repression by c-Myc on PDGF beta-receptor, *J Cell Sci.* 114, 1533-44.

JOHNSON, B. A., and BLEVINS, R. A. (1994) NMRView: a computer program for the visualization and analysis of NMR data, *J. Biomol. NMR* 4, 603-614.

JOHNSON WC (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide, *Proteins* 7, 205-14.

JUNIUS FK, MACKAY JP, BUBB WA, JENSEN SA, WEISS AS, KING GF. (1995) Nuclear magnetic resonance characterization of the Jun leucine zipper domain: unusual properties of coiled-coil interfacial polar residues, *Biochemistry* 34, 6164-74.

KAY, L, KEIFER P, SAARINEN T (1992) Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensibility, *J. Am. Chem. Soc.* 114; 10663-10665.

KELLY SM, JESS TJ, PRICE NC. (2005) How to study proteins by circular dichroism, *Biochim Biophys Acta.* 1751; 119-39.

KIM NW, PIATYSZEK MA, PROWSE KR, HARLEY CB, WEST MD, HO PL, COVIELLO GM, WRIGHT WE, WEINRICH SL, SHAY JW. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer, *Science* 266, 2011-5.

KIM SY, HERBST A, TWORKOWSKI KA, SALGHETTI SE, TANSEY WP. (2003) Skp2 regulates Myc protein stability and activity, *Mol Cell.* 11, 1177-88

KIM JW, ZELLER KI, WANG Y, JEGGA AG, ARONOW BJ, O'DONNELL KA, DANG CV. (2004) Evaluation of myc E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. *Mol Cell Biol.* 2004 24, 5923-36.

KIME L, WRIGHT SC. (2003) Mad4 is regulated by a transcriptional repressor complex that contains Miz-1 and c-Myc, *Biochem J.* 370(Pt 1), 291-8.

KNIES-BAMFORTH UE, FOX SB, POULSOM R, EVAN GI, HARRIS AL. (2004) c-Myc interacts with hypoxia to induce angiogenesis in vivo by a vascular endothelial growth factor-dependent mechanism, *Cancer Res.* 64, 6563-70.

KORBER, P, HORZ, W (2004) SWRed not shaken; mixing the histones, *Cell* 117, 5-7.

KOBOR MS, VENKATASUBRAHMANYAM S, MENEGHINI MD, GIN JW, JENNINGS JL, LINK AJ, MADHANI HD, RINE J. (2004) A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin, *PLoS Biol.* 2, E131

KOZAR K, CIEMERYCH MA, REBEL VI, SHIGEMATSU H, ZAGOZDZON A, SICINSKA E, GENG Y, YU Q, BHATTACHARYA S, BRONSON RT, AKASHI K, SICINSKI P. (2004) Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins, *Cell* 118, 477-91.

KRIPPNER-HEIDENREICH A, TALANIAN RV, SEKUL R, KRAFT R, THOLE H, OTTLEBEN H, LUSCHER B. (2001) Targeting of the transcription factor Max during apoptosis: phosphorylation-regulated cleavage by caspase-5 at an unusual glutamic acid residue in position P1, *Biochem J.* 358(Pt 3); 705-15.

KRYLOV D, KASAI K, ECHLIN DR, TAPAROWSKY EJ, ARNHEITER H, VINSON C. (1997) A general method to design dominant negatives to B-HLHZip proteins that abolish DNA binding, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94; 12274-9.

KUSCH T, FLORENS L, MACDONALD WH, SWANSON SK, GLASER RL, YATES JR 3RD, ABMAYR SM, WASHBURN MP, WORKMAN JL. (2004) Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions, *Science* 306, 2084-7

KYO S, TAKAKURA M, KANAYA T, ZHUO W, FUJIMOTO K, NISHIO Y, ORIMO A, INOUE M. (1999) Estrogen activates telomerase, *Cancer Res.* 59; 5917-21.

KYO S, TAKAKURA M, TAIRA T, KANAYA T, ITOH H, YUTSUDO M, ARIGA H, INOUE M. (2000) Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res.* 28, 669-77.

LAND H, PARADA LF, WEINBERG RA. (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes, *Nature.* 304. 596-602

LANDSCHULZ WH, JOHNSON PF, MCKNIGHT SL (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding, *Protein Science* 240, 1759-64.

LANG SE, HEARING P. (2003) The adenovirus E1A oncoprotein recruits the cellular TRRAP/GCN5 histone acetyltransferase complex. *Oncogene* 22, 2836-41.

LASORELLA A, NOSEDA M, BEYNA M, YOKOTA Y, IAVARONE A. (2000) Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins, *Nature* 407, 592-8.

LAVIGNE P, KONDEJEWSKI LH, HOUSTON ME JR, SONNICHSEN FD, LIX B, SKYES BD, HODGES RS, KAY CM. (1995) Preferential heterodimeric parallel coiled-coil formation by synthetic Max and c-Myc leucine zippers: a description of putative electrostatic interactions responsible for the specificity of heterodimerization, *J Mol Biol.* 254, 505-20.

LAVIGNE P, SONNICHSEN FD, KAY CM, HODGES RS. (1996) Interhelical salt bridges, coiled-coil stability, and specificity of dimerization, *Science* 271, 1136-8.

LAVIGNE P, CRUMP MP, GAGNE SM, HODGES RS, KAY CM, SYKES BD. (1998) Insights into the mechanism of heterodimerization from the 1H-NMR solution structure of the c-Myc-Max heterodimeric leucine zipper, *J Mol Biol.* 281, 165-81.

LEE TC, LI L, PHILIPSON L, ZIFF EB. (1997) Myc represses transcription of the growth arrest gene *gas1*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 12886-91.

LEE JH, CHANG SH, SHIM JH, LEE JY, YOSHIDA M, KWON H. (2003) Cytoplasmic localization and nucleo-cytoplasmic shuttling of BAF53, a component of chromatin-modifying complexes. *Mol Cells* 16, 78-83.

LI Z, VAN CALCAR S, QU C, CAVENEE WK, ZHANG MQ, REN B. (2003) A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 8164-9

LINIAL M, GUNDERSON N, GROUDINE M. (1985) Enhanced transcription of c-myc in bursal lymphoma cells requires continuous protein synthesis, *Science* 230, 1126-32.

LODISH, HARVEY; BERK, ARNOLD; ZIPURSKY, S. LAWRENCE; MATSUDAIRA, PAUL; BALTIMORE, DAVID; DARNELL, JAMES E. (2000) *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W. H. Freeman & Co., 1058-59.

LOSSOS IS, ALIZADEH AA, DIEHN M, WARNKE R, THORSTENSON Y, OEFNER PJ, BROWN PO, BOTSTEIN D, LEVY R. (2002) Transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma: alternative patterns with

increased or decreased expression of c-myc and its regulated genes, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 8886-91.

LUSCHER B. (2001) Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network, *Gene.* 277, 1-14

LUTZ W, LEON J, EILERS M (2002) Contributions of Myc to tumorigenesis, *Biochim Biophys Acta.* 1602, 61-71

MARIADASON JM, NICHOLAS C, L'ITALIEN KE, ZHUANG M, SMARTT HJ, HEERDT BG, YANG W, CORNER GA, WILSON AJ, KLAMPFER L., ARANGO D, AUGENLICHT LH. (2005) Gene expression profiling of intestinal epithelial cell maturation along the crypt-villus axis, *Gastroenterology* 128, 1081-8

MASUTOMI K, YU EY, KHURTS S, BEN-PORATH I, CURRIER JL, METZ GB, BROOKS MW, KANEKO S, MURAKAMI S, DECAPRIO JA, WEINBERG RA, STEWART SA, HAHN WC. (2003) Telomerase maintains telomere structure in normal human cells, *Cell* 114, 241-53.

MCTMAHON SB, WOOD MA, COLE MD. (2000) The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc, *Mol Cell Biol.* 20, 556-62.

MCTMAHON SB, VAN BUSKIRK HA, DUGAN KA, COPELAND TD, COLE MD. (1998) The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins, *Cell.* 94, 363-74.

MILTENBERGER RJ, SUKOW KA, FARNHAM PJ. (1995) An E-box-mediated increase in cad transcription at the G1/S-phase boundary is suppressed by inhibitory c-Myc mutants, *Mol Cell Biol.* 15, 2527-35.

MONTAGNE M, NAUD JF, MCDUFF FO, LAVIGNE P. (2005) Toward the elucidation of the structural determinants responsible for the molecular recognition between Mad1 and Max. *Biochemistry* 44;12860-9.

MUHLE-GOLL C, NILGES M, PASTORE A. (1995) The leucine zippers of the HLH-LZ proteins Max and c-Myc preferentially form heterodimers, *Biochemistry* 34;13554-64.

NAIR SK, BURLEY SK. (2003) X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors, *Cell* 112; 193-205.

NAIR SK, BURLEY SK. (2006) Structural aspects of interactions within the Myc/Max/Mad network, *Curr Top Microbiol Immunol.* 302;123-43.

MURRE C, MCCAWE PS, VAESSIN H, CAUDY M, JAN LY, JAN YN, CABRERA CV, BUSKIN JN, HAUSCHKA SD, LASSAR AB, ET AL. (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-44.

NAUD JF, GAGNON F, WELLINGER R, CHABOT B, LAVIGNE P (2003) Improving the thermodynamic stability of the leucine zipper of max increases the stability of its b-HLH-LZ:E-box complex, *J Mol Biol.* 326, 1577-95.

NAUD JF, MCDUFF FO, SAUVE S, MONTAGNE M, WEBB BA, SMITH SP, CHABOT B, LAVIGNE P. (2005) Structural and thermodynamical characterization of the complete p21 gene product of Max, *Biochemistry* 44, 12746-58.

OSTER SK, HO CS, SOUCIE EL, PENN LZ (2002) The myc oncogene: Marvelously Complex, *Adv Cancer Res.* 84, 81-154

PARK J, WOOD MA, COLE MD. (2002) BAF53 forms distinct nuclear complexes and functions as a critical c-Myc-interacting nuclear cofactor for oncogenic transformation. *Mol Cell Biol.* 22, 1307-16

PARK J, KUNJIBETTU S, MCMAHON SB, COLE MD. (2001) The ATM-related domain of TRRAP is required for histone acetyltransferase recruitment and Myc-dependent oncogenesis, *Genes Dev.* 15, 1619-24.

PELENGARIS, S. AND KHAN, M. (2003) The many faces of c-Myc., *Arch. Biochem. Biophys.* 416, 129-136

PEUKERT K, STALLER P, SCHNEIDER A, CARMICHAEL G, HANEL F, EILERS M. (1997) An alternative pathway for gene regulation by Myc, *EMBO J.* 16, 5672-86.

PLATTNER R, GUPTA S, KHOSRAVI-FAR R, SATO KY, PERUCHO M, DER CJ, STANBRIDGE EJ. (1999) Differential contribution of the ERK and JNK mitogen-activated protein kinase cascades to Ras transformation of HT1080 fibrosarcoma and DLD-1 colon carcinoma cells, *Oncogene* 18;1807-17.

PRENDERGAST GC, COLE MD. (1989), Posttranscriptional regulation of cellular gene expression by the c-myc oncogene, *Mol Cell Biol*, 1, 124-34.

PURSGLOVE SE, FLADVAD M, BELLANDA M, MOSHREF A, HENRIKSSON M, CAREY J, SUNNERHAGEN M. (2004) Biophysical properties of regions flanking the bHLH-Zip motif in the p22 Max protein, *Biochem Biophys Res Commun.* 323; 750-9.



QUEVA C, MCARTHUR GA, IRITANI BM, EISENMAN RN. (2001) Targeted deletion of the S-phase-specific Myc antagonist Mad3 sensitizes neuronal and lymphoid cells to radiation-induced apoptosis, *Mol Cell Biol.* 21; 703-12.

RAISNER, RM, MADHANI, HD (2006) Patterning chromatin: form and function for H2A.Z variant nucleosomes, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 119-124.

RAMSAY G, HAYMAN MJ, BISTER K. (1982) Phosphorylation of specific sites in the gag-myc polyproteins encoded by MC29-type viruses correlates with their transforming ability, *EMBO J.* 1, 1111-6

ROTTMANN S. AND B. LUSCHER (2006) The Mad Side of the Max Network : Antagonizing the Function of Myc and More, *CTMI* 302, 63-122

ROY AL, CARRUTHERS C, GUTJAHR T, ROEDER RG. (1993) Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I, *Nature* 365, 359-61.

SAUVE S, TREMBLAY L, LAVIGNE P. (2004) The NMR solution structure of a mutant of the Max b/HLH/LZ free of DNA: insights into the specific and reversible DNA binding mechanism of dimeric transcription factors, *J Mol Biol.* 342; 813-32.

SAUVÉ S, NAUD JF, LAVIGNE P, (2006) The Mechanism of Discrimination Between Cognate and Non-Specific DNA by Dimeric b-HLH-LZ transcription Factors, *J. Mol. Biol.* En revision

SCHNEIDER A, PEUKERT K, EILERS M, HANEL F. (1997) Association of Myc with the zinc-finger protein Miz-1 defines a novel pathway for gene regulation by Myc, *Curr Top Microbiol Immunol.* 224, 137-46.

SCHUCK P, PERUGINI MA, GONZALES NR, HOWLETT GJ, SCHUBERT D. (2002) Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems, *Biophys J.* 82; 1096-111.

SEARS R, LEONE G, DEGREGORI J, NEVINS JR. (1999) Ras enhances Myc protein stability, *Mol Cell.* 3, 169-79.

SEARS R, NUCKOLLS F, HAURA E, TAYA Y, TAMAI K, NEVINS JR. (2000) Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability, *Genes Dev.* 14, 2501-14

SEOANE J, LE HV, MASSAGUE J. (2002) Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage, *Nature* 419, 729-34.

SEOANE J, POUPONNOT C, STALLER P, SCHADER M, EILERS M, MASSAGUE J. (2001) TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b, *Nat Cell Biol.* 3, 400-8.

SIEGEL PM, SHU W, MASSAGUE J. (2003) Mad upregulation and Id2 repression accompany transforming growth factor (TGF)-beta-mediated epithelial cell growth suppression, *J Biol Chem.* 278, 35444-50.

SHIM H, DOLDE C, LEWIS BC, WU CS, DANG G, JUNGSMANN RA, DALLA-FAVERA R, DANG CV. (1997) c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6658-63.

STALLER P, PEUKERT K, KIERMAIER A, SEOANE J, LUKAS J, KARSUNKY H, MOROY T, BARTEK J, MASSAGUE J, HANEL F, EILERS M. (2001) Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1 *Nat Cell Biol.* 3, 392-9.

TAKAYAMA MA, TAIRA T, TAMAI K, IGUCHI-ARIGA SM, ARIGA H. (2000) ORC1 interacts with c-Myc to inhibit E-box-dependent transcription by abrogating c-Myc-SNF5/INI1 interaction. *Genes Cells* 5, 481-90.

TAUB R, KIRSCH I, MORTON C, LENOIR G, SWAN D, TRONICK S, AARONSON S, LEDER P. (1982) Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7837-41.

TOBIAS KE, SHOR J, KAHANA C. (1995) c-Myc and Max transregulate the mouse ornithine decarboxylase promoter through interaction with two downstream CACGTG motifs, *Oncogene.* 11, 1721-7.

TRIPET B, WAGSCHAL K, LAVIGNE P, MANT CT, HODGES RS. (2000) Effects of side-chain characteristics on stability and oligomerization state of a de novo-designed model coiled-coil: 20 amino acid substitutions in position "d", *J Mol Biol.* 300; 377-402.

VAN DE WETERING M, SANCHO E, VERWEIJ C, DE LAU W, OVIING I, HURLSTONE A, VAN DER HORN K, BATLLE E, COUDREUSE D, HARAMIS AP, TJON-PON-FONG M, MOERER P, VAN DEN BORN M, SOETE G, PALS S, EILERS M, MEDEMA R, CLEVERS H. (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells, *Cell.* 111, 241-50.

VON DER LEHR N, JOHANSSON S, LARSSON LG. (2003) Implication of the ubiquitin/proteasome system in Myc-regulated transcription, *Cell Cycle* 2, 403-7.

WAGSCHAL K, TRIPET B, LAVIGNE P, MANT C, HODGES RS. (1999) The role of position a in determining the stability and oligomerization state of alpha-helical coiled coils: 20 amino acid stability coefficients in the hydrophobic core of proteins, *Protein Science* 8; 2312-29.

WANZEL M, KLEINE-KOHLBRECHER D, HEROLD S, HOCK A, BERNS K, PARK J, HEMMINGS B, EILERS M. (2005) Akt and 14-3-3 beta regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage, *Nat Cell Biol.* 7, 30-41.

WATERS CM, LITTLEWOOD TD, HANCOCK DC, MOORE JP, EVAN GI. (1991) c-myc protein expression in untransformed fibroblasts. *Oncogene.* 6, 797-805

WEIGELT J, MILES CS, DIXON NE, OTTING G. (1998) Backbone NMR assignments and secondary structure of the N-terminal domain of DnaB helicase from *E. coli*, *J Biomol NMR.* 11; 233-4.

WEINRICH SL, PRUZAN R, MA L, OUELLETTE M, TESMER VM, HOLT SE, BODNAR AG, LICHTSTEINER S, KIM NW, TRAGER JB, TAYLOR RD, CARLOS R, ANDREWS WH, WRIGHT WE, SHAY JW, HARLEY CB, MORIN GB. (1997) Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT, *Nat Genet.* 17; 498-502.

WELCKER M, ORIAN A, JIN J, GRIM JE, HARPER JW, EISENMAN RN, CLURMAN BE. (2004) The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9085-90

WELCKER M, ORIAN A, GRIM JE, EISENMAN RN, CLURMAN BE. (2004) A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size, *Curr Biol.* 14, 1852-7

WOOLFSON DN, ALBER T. (1995) Predicting oligomerization states of coiled coils, *Protein Science* 4; 1596-607.

WU S, CETINKAYA C, MUNOZ-ALONSO MJ, VON DER LEHR N, BAHRAM F, BEUGER V, EILERS M, LEON J, LARSSON LG. (2003) Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter, *Oncogene.* 22, 351-60.

YADA M, HATAKEYAMA S, KAMURA T, NISHIYAMA M, TSUNEMATSU R, IMAKI H, ISHIDA N, OKUMURA F, NAKAYAMA K, NAKAYAMA KI. (2004) Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7, *EMBO J.* 23, 2116-25.

YANG W, SHEN J, WU M, ARSURA M, FITZGERALD M, SULDAN Z, KIM DW, HOFMANN CS, PIANETTI S, ROMIEU-MOUREZ R, FREEDMAN LP, SONENSHEIN GE. (2001) Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc, *Oncogene*. 20, 1688-702.

YEILDING NM, REHMAN MT, LEE WM. (1996) Identification of sequences in c-myc mRNA that regulate its steady-state levels, *Mol Cell Biol*. 1996 16, 3511-22.

YEH E, CUNNINGHAM M, ARNOLD H, CHASSE D, MONTEITH T, IVALDI G, HAHN WC, STUKENBERG PT, SHENOLIKAR S, UCHIDA T, COUNTER CM, NEVINS JR, MEANS AR, SEARS R. (2004) A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells, *Nat Cell Biol*. 6, 308-18.

ZERVOS AS, GYURIS J, BRENT R. (1993) Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites, *Cell* 72, 223-32.

ZINDY F, EISCHEN CM, RANDLE DH, KAMIJO T, CLEVELAND JL, SHERR CJ, ROUSSEL MF. (1998) Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*. 12, 2424-33.